



Susu coklat bubuk



© BSN 2009

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang menyalin atau menggandakan sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun dan dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN
Gd. Manggala Wanabakti
Blok IV, Lt. 3,4,7,10.
Telp. +6221-5747043
Fax. +6221-5747045
Email: dokinfo@bsn.go.id
www.bsn.go.id

Diterbitkan di Jakarta

Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata	ii
1 Ruang lingkup.....	1
2 Istilah dan definisi	1
3 Komposisi	1
4 Syarat mutu	1
5 Pengambilan contoh	2
6 Cara uji	2
7 Syarat lulus uji	3
8 Higiene.....	3
9 Pengemasan.....	3
10 Syarat penandaan.....	3
Lampiran A (normatif) Cara pengambilan contoh susu coklat bubuk.....	4
Lampiran A.1 (normatif) Rancangan pengambilan contoh	6
Lampiran B (normatif) Cara uji susu coklat bubuk.....	8
Bibliografi.....	41
Gambar B.1 - Tingkat pengenceran menggunakan larutan pengencer BPB	25
Tabel 1 - Syarat mutu susu coklat bubuk	2
Tabel A.1.1 - Nilai N, n dan c untuk bobot bersih sama atau kurang dari 1 kg.....	6
Tabel A.1.2 - Nilai N, n dan c untuk bobot bersih lebih dari 1 kg tapi tidak lebih dari 4,5 kg ...	6
Tabel A.1.3 Nilai N, n dan c untuk bobot bersih lebih dari 4,5 kg	6
Tabel A.1.4 Nilai N, n dan c untuk bobot bersih sama atau kurang dari 1 kg	7
Tabel A.1.5 Nilai N, n dan c untuk bobot bersih lebih dari 1 kg tapi tidak lebih dari 4,5 kg .	7
Tabel A.1.6 - Nilai N, n dan c untuk bobot bersih lebih dari 4,5 kg	7
Tabel B.1 - Ekuivalen natrium tiosulfat	14
Tabel B.2 - Reaksi biokimia <i>E. coli</i> pada uji IMVIC.....	30
Tabel B.3 - APM per 1 g contoh bila menggunakan 3 tabung untuk setiap tingkat pengenceran 0,1; 0,01; dan 0,001 g/ml contoh	30
Tabel B.4 - Reaksi biokimia dan serologi untuk <i>Salmonella sp.</i>	37
Tabel B.5 - Reaksi biokimia dan serologi untuk non <i>Salmonella sp.</i>	37

Prakata

Standar Nasional Indonesia (SNI) *Susu coklat bubuk* merupakan SNI baru.

Tujuan penyusunan standar ini adalah:

- Melindungi kesehatan konsumen;
- Menjamin perdagangan produk pangan yang jujur dan bertanggung jawab;
- Diversifikasi produk/pengembangan produk ;
- Mendukung perkembangan industri kakao;

Standar ini dirumuskan dengan memperhatikan hal-hal yang tertera dalam:

1. Undang-undang RI No. 7 Tahun 1996 tentang Pangan;
2. Undang-undang RI No. 8 Tahun 1999 tentang Perlindungan Konsumen;
3. Peraturan Pemerintah No. 69 Tahun 1999 tentang Label dan Iklan Pangan;
4. Keputusan Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan No. 03725/B/SK/VII/89 tentang Batas Maksimum Cemaran Logam Berat dalam Makanan dan Minuman atau revisinya.
5. Keputusan Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan No. 03726/B/SK/VII/89 tentang Batas Maksimum Cemaran Mikroba dalam Makanan dan Minuman atau revisinya.

Standar ini dirumuskan oleh Panitia Teknis 67 - 04 Makanan dan minuman. Standar ini telah dibahas melalui rapat teknis dan disepakati dalam rapat konsensus pada tanggal 9 Desember 2008 di Jakarta. Hadir dalam rapat tersebut wakil dari konsumen, produsen, lembaga pengujian, Lembaga IPTEK dan instansi terkait lainnya.

Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada tanggal 24 Juni 2009 sampai dengan tanggal 22 Agustus 2009 dengan hasil RASNI.

Susu coklat bubuk

1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan istilah dan definisi, syarat mutu, pengambilan contoh dan cara uji susu coklat bubuk.

2 Istilah dan definisi

2.1

susu coklat bubuk

produk susu berbentuk bubuk, dibuat dari susu bubuk dan coklat bubuk dengan atau tanpa penambahan gula, bahan pangan lain dan bahan tambahan pangan yang diizinkan

2.2

susu bubuk

produk susu yang diperoleh dengan cara mengurangi sebagian besar air melalui proses pengeringan susu segar dan atau susu rekombinasi yang telah dipasteurisasi, dengan atau tanpa penambahan vitamin, mineral, dan bahan tambahan pangan yang diizinkan

2.3

susu rekombinasi

produk susu yang diperoleh dengan cara melarutkan kembali susu bubuk atau susu skim bubuk dan lemak susu dengan air, dengan atau tanpa penambahan susu segar, vitamin, mineral, dan bahan tambahan pangan yang diizinkan

2.4

coklat bubuk

produk yang diperoleh dari bungkil kakao dengan atau tanpa perlakuan alkalinasi yang diubah bentuknya menjadi bubuk

3 Komposisi

3.1 Bahan baku utama

susu bubuk dan coklat bubuk.

3.2 Bahan pangan lain yang dapat ditambahkan

bahan pangan yang diizinkan sesuai dengan ketentuan yang berlaku

3.3 Bahan tambahan pangan

bahan tambahan pangan yang diizinkan sesuai dengan ketentuan yang berlaku

4 Syarat mutu

Syarat mutu susu coklat bubuk sesuai Tabel 1 di bawah ini.

Tabel 1 - Syarat mutu susu coklat bubuk

No	Kriteria uji	Satuan	Persyaratan
1	Keadaan		
1.1	Bau	-	Normal/ Khas
1.2	Rasa	-	Normal/ Khas
1.3	Warna	-	Kecoklatan
2	Kadar air (b/b)	%	maks. 5,0
3	Kadar protein (N X 6,38) (b/b)	%	min. 11,0
4	Kadar gula (dihitung sebagai sakarosa) (b/b)	%	maks. 55
5	Cemaran logam		
5.1	Timbal (Pb)	mg/kg	maks. 0,02 ^{*)}
5.2	Timah (Sn)	mg/kg	maks. 40,0
5.3	Merkuri (Hg)	mg/kg	maks. 0,03 ^{*)}
5.4	Kadmium (Cd)	mg/kg	maks. 0,2
6	Cemaran arsen (As)	mg/kg	maks. 0,1 ^{*)}
7	Cemaran mikroba		
7.1	Angka lempeng total	koloni/g	maks. 5×10^4
7.2	Bakteri <i>coliform</i>	APM/g	maks. 10
7.3	<i>Escherichia coli</i>	APM/g	< 3
7.4	<i>Staphylococcus aureus</i>	koloni/g	maks. 1×10^2
7.5	<i>Salmonella sp./ 25 g</i>	-	negatif
7.6	Kapang dan khamir	koloni/g	maks. 1×10^2
CATATAN: ^{*)} dihitung terhadap produk siap konsumsi			

5 Pengambilan contoh

Cara pengambilan contoh seperti tercantum pada Lampiran A.

6 Cara uji

Cara uji untuk susu coklat bubuk seperti di bawah ini:

- a) Persiapan contoh sesuai Lampiran B.1.
- b) Cara uji keadaan seperti pada Lampiran B.2
 - Cara uji bau seperti pada Lampiran B.2.1
 - Cara uji rasa seperti pada Lampiran B.2.2

- Cara uji warna seperti pada Lampiran B.2.3
- c) Cara uji kadar air seperti pada Lampiran B.3.
- d) Cara uji protein seperti pada Lampiran B.4.
- e) Cara uji kadar gula dihitung sebagai sakarosa seperti pada Lampiran B.5.
- f) Cara uji cemaran logam seperti pada Lampiran B.6
 - Cara uji timbal (Pb) dan kadmium (Cd) seperti pada Lampiran B.6.1.
 - Cara uji timah (Sn) seperti pada Lampiran B.6.2.
 - Cara uji merkuri (Hg) seperti pada Lampiran B.6.3.
- g) Cara uji cemaran arsen (As) seperti pada Lampiran B.7.
- h) Cara uji cemaran mikroba seperti pada Lampiran B.8.
 - Cara uji angka lempeng total seperti pada Lampiran B.8.2.
 - Cara uji bakteri *coliform* dan *Escherichia coli* seperti pada Lampiran B.8.3.
 - Cara uji *Salmonella* sp seperti pada Lampiran B.8.4.
 - Cara uji *Staphylococcus aureus* seperti pada Lampiran B.8.5.
 - Cara uji kapang dan khamir seperti pada Lampiran B.8.6.

7 Syarat lulus uji

Produk dinyatakan lulus uji apabila memenuhi syarat mutu sesuai Pasal 4.

8 Higiene

Cara memproduksi produk yang higienis termasuk cara penyiapan dan penanganannya sesuai dengan ketentuan yang berlaku tentang Pedoman Cara Produksi Pangan yang Baik.

9 Pengemasan

Susu coklat bubuk dikemas dalam wadah yang tertutup rapat, tidak dipengaruhi atau mempengaruhi isi, aman selama penyimpanan dan pengangkutan.

10 Syarat penandaan

Syarat penandaan sesuai dengan ketentuan peraturan yang berlaku tentang label dan iklan pangan.

Lampiran A (normatif) Cara pengambilan contoh susu coklat bubuk

A.1 Prinsip

Pengambilan contoh susu coklat bubuk yang dikemas dengan cara melihat banyaknya unit contoh yang cacat pada AQL 6,5 dan contoh diambil secara acak.

A.2 Penerapan pengambilan contoh

A.2.1 Informasi yang diperlukan

Dalam menggunakan rancangan pengambilan contoh dalam Lampiran A.1 diperlukan beberapa informasi sebagai berikut:

- a) Tingkat inspeksi;
- b) Ukuran lot (N);
- c) Ukuran kemasan terkecil (bobot bersih dalam g); dan
- d) Ketentuan standar mengenai kualitas produk yang dikehendaki, misalkan penggolongan cacat dan jumlah cacat yang diperbolehkan dari sejumlah lot yang diperiksa.

A.2.2 Inspeksi

- a) Pemilihan tingkat inspeksi berdasarkan:
Tingkat inspeksi I, digunakan untuk pengambilan contoh normal (biasa).
Tingkat inspeksi II, digunakan untuk pengambilan contoh bila terjadi sanggahan terhadap hasil pengujian menurut tingkat inspeksi I, atau bila diperlukan hasil pengujian yang lebih menyakinkan.
- b) tentukan ukuran lot (N), misalkan jumlah kemasan terkecil Susu coklat bubuk
- c) tentukan ukuran contoh (n) yang akan diambil dari suatu lot yang diperiksa, yang didasarkan pada ukuran lot, ukuran kemasan terkecil, dan tingkat inspeksi. Penentuan ukuran contoh dapat dilihat pada Lampiran A.1.
- d) ambil secara acak sejumlah ukuran contoh (n) yang diperlukan dari lot
- e) uji produk berdasarkan standar. Identifikasi setiap kemasan atau unit contoh yang tidak memenuhi spesifikasi yang terdapat dalam persyaratan standar dan dinyatakan cacat berdasarkan penggolongan cacat yang terdapat dalam standar.
- f) gunakan rancangan pengambilan contoh pada Lampiran A.1.
- h) nyatakan bahwa lot diterima jika cacat sama atau kurang dari jumlah cacat yang diperbolehkan (c) dan lot ditolak jika cacat melebihi jumlah cacat yang diperbolehkan (c).

A.2.3 Penerapan rancangan pengambilan contoh

A.2.3.1 Tingkat inspeksi I

Misalkan lot terdiri dari 1200 karton yang berisi kemasan berukuran 12 x 400 g setiap kartonnya. Keputusan diambil menggunakan Tingkat Inspeksi I karena produk tersebut belum pernah diuji dan belum pernah mendapat sanggahan mengenai kualitasnya.

- | | |
|-------------------|-------------------------------|
| a) ukuran lot (N) | : 1.200 x 12 atau 14.400 unit |
| b) ukuran kemasan | : 400 g |

- c) tingkat inspeksi : I (lihat rancangan pengambilan contoh 1, lampiran A.1)
- d) ukuran contoh (n) : 13
- e) jumlah maksimum cacat yang diterima (c) : 2

Lot diterima apabila jumlah cacat yang ditemukan dari 13 contoh yang diuji sama atau kurang dari 2 dan lot ditolak apabila jumlah cacat yang ditemukan dari 13 kemasan yang diuji lebih besar dari 2.

A.2.3.2 Tingkat inspeksi II

Bila hasil pengujian pertama mendapat sanggahan (A.2.3.1) maka harus dilakukan pemeriksaan ulangan terhadap lot tersebut dengan ukuran contoh yang lebih banyak sesuai dengan tingkat inspeksi II.

- a) ukuran lot (N) : 1.200 x 12 atau 14.400 unit
- b) ukuran kemasan : 400 g
- c) tingkat inspeksi : II (lihat rancangan pengambilan contoh 2, lampiran A.1)
- d) ukuran contoh (n) : 21
- e) jumlah maksimum cacat yang diterima (c) : 3

A.2.4 Catatan mengenai ukuran contoh

Tidak perlu membatasi ukuran contoh sebagai minimum untuk ukuran lot dan tingkat inspeksi yang tepat. Dalam semua kasus, contoh yang lebih besar dapat dipilih. Dalam contoh A.2.3.2 perkiraan yang lebih dipercaya mengenai mutu lot dapat dibuat dengan mengambil contoh sebanyak 29 atau 48 dan menggunakan jumlah ketentuan, jumlah maksimum cacat yang diterima sebanyak 6 atau 9.

Lampiran A.1
(normatif)
Rancangan pengambilan contoh

Rancangan pengambilan contoh 1 (Tingkat inspeksi I, AQL = 6,5)

Tabel A.1.1 - Nilai N, n dan c untuk bobot bersih sama atau kurang dari 1 kg

Ukuran lot (N)	Ukuran contoh (n)	Jumlah maksimum cacat yang diterima (c)
4.800 atau kurang	6	1
4.801 – 24.000	13	2
24.001 – 48.000	21	3
48.001 – 84.000	29	4
84.001 – 144.000	48	6
144.001 – 240.000	84	9
Lebih dari 240.000	126	13

**Tabel A.1.2 - Nilai N, n dan c untuk bobot bersih lebih dari 1 kg
tapi tidak lebih dari 4,5 kg**

Ukuran lot (N)	Ukuran contoh (n)	Jumlah maksimum cacat yang diterima (c)
2.400 atau kurang	6	1
2.401 – 15.000	13	2
15.001 – 24.000	21	3
24.001 – 42.000	29	4
42.001 – 72.000	48	6
72.001 – 120.000	84	9
Lebih dari 120.000	126	13

Tabel A.1.3 Nilai N, n dan c untuk bobot bersih lebih dari 4,5 kg

Ukuran lot (N)	Ukuran contoh (n)	Jumlah maksimum cacat yang diterima (c)
600 atau kurang	6	1
601 – 2.000	13	2
2.001 – 7.200	21	3
7.201 – 15.000	29	4
15.001 – 24.000	48	6
24.001 – 42.000	84	9
Lebih dari 42.000	126	13

Rancangan pengambilan contoh 2 (Tingkat inspeksi II, AQL = 6.5)

Tabel A.1.4 Nilai N, n dan c untuk bobot bersih sama atau kurang dari 1 kg

Ukuran lot (N)	Ukuran contoh (n)	Jumlah maksimum cacat yang diterima (c)
4.800 atau kurang	13	2
4.801 – 24.000	21	3
24.001 – 48.000	29	4
48.001 – 84.000	48	6
84.001 – 144.000	84	9
144.001 – 240.000	126	13
Lebih dari 240.000	200	19

Tabel A.1.5 Nilai N, n dan c untuk bobot bersih lebih dari 1 kg tapi tidak lebih dari 4,5 kg

Ukuran lot (N)	Ukuran contoh (n)	Jumlah maksimum cacat yang diterima (c)
2.400 atau kurang	13	2
2.401 – 15.000	21	3
15.001 – 24.000	29	4
24.001 – 42.000	48	6
42.001 – 72.000	84	9
72.001 – 120.000	126	13
Lebih dari 120.000	200	19

Tabel A.1.6 - Nilai N, n dan c untuk bobot bersih lebih dari 4,5 kg

Ukuran lot (N)	Ukuran contoh (n)	Jumlah maksimum cacat yang diterima (c)
600 atau kurang	13	2
601 – 2.000	21	3
2.001 – 7.200	29	4
7.201 – 15.000	48	6
15.001 – 24.000	84	9
24.001 – 42.000	126	13
Lebih dari 42.000	200	19

Lampiran B
(normatif)
Cara uji susu coklat bubuk

B.1 Persiapan contoh

Pengambilan contoh untuk uji mikrobiologi dilakukan pertama, kemudian dilanjutkan dengan pengambilan contoh untuk uji organoleptik dan analisis kimia. Pengambilan contoh diupayakan dari kemasan yang sama.

B.1.1 Persiapan contoh untuk uji mikrobiologi

Buka kemasan Susu coklat bubuk dan ambil contoh Susu coklat bubuk sesuai yang diperlukan minimum 400 g secara aseptik dengan menggunakan sendok steril kemudian tempatkan dalam botol contoh steril.

B.1.2 Persiapan contoh untuk uji organoleptik dan analisis kimia

Buka kemasan Susu coklat bubuk dan ambil contoh Susu coklat bubuk sesuai yang diperlukan minimum 400 g secara hati-hati dengan menggunakan sendok yang bersih dan kering kemudian tempatkan dalam botol contoh yang bersih dan kering.

B.2 Keadaan**B.2.1 Bau****B.2.1.1 Prinsip**

Melakukan analisis terhadap contoh uji secara organoleptik dengan menggunakan indera penciuman (hidung).

B.2.1.2 Cara kerja**B.2.1.2.1 Serbuk Susu coklat bubuk**

- a) ambil contoh uji kira-kira 5 g dan letakkan diatas gelas arloji yang bersih dan kering;
- b) cium contoh uji pada jarak kira-kira $\frac{1}{2}$ cm dari hidung untuk mengetahui baunya;
- c) lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis atau 1 orang tenaga ahli.

B.2.1.2.2 Larutan Susu coklat bubuk

- a) buat larutan Susu coklat bubuk sesuai syarat saji yang tertera pada kemasan di dalam gelas yang bersih dan kering;
- b) cium contoh uji pada jarak kira-kira $\frac{1}{2}$ cm dari hidung untuk mengetahui baunya;
- c) lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis atau 1 orang tenaga ahli.

B.2.1.2.3 Cara menyatakan hasil

- a) jika tercium bau khas Susu coklat bubuk, maka hasil dinyatakan "normal";
- b) jika tercium bau asing selain bau khas Susu coklat bubuk, maka hasil dinyatakan "tidak normal".

B.2.2 Rasa

B.2.2.1 Prinsip

melakukan analisis terhadap contoh uji secara organoleptik dengan menggunakan indera pengecap.

B.2.2.2 Cara kerja

B.2.2.2.1 Serbuk Susu coklat bubuk

- a) ambil kira-kira 1 sendok contoh uji dan rasakan dengan lidah;
- b) lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis atau 1 orang tenaga ahli.

B.2.2.2.2 Larutan Susu coklat bubuk

- a) buat larutan Susu coklat bubuk sesuai syarat saji yang tertera pada kemasan di dalam gelas yang bersih dan kering;
- b) ambil kira-kira 1 sendok larutan Susu coklat bubuk dan rasakan dengan lidah;
- c) lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis atau 1 orang tenaga ahli.

B.2.2.3 Cara menyatakan hasil

- a) Jika terasa khas Susu coklat bubuk, maka hasil dinyatakan "normal";
- b) Jika terasa rasa asing selain rasa khas Susu coklat bubuk, maka hasil dinyatakan "tidak normal".

B.2.3. Warna

B.2.3.1 Prinsip

Melakukan analisis terhadap contoh uji secara organoleptik dengan menggunakan mata sebagai indera penglihatan.

B.2.3.2 Cara kerja

- a) ambil contoh uji yang sudah dilarutkan dalam air sebanyak 50 ml;
- b) amati warna contoh uji;
- c) lakukan pengerjaan minimal oleh 3 panelis atau 1 panelis terlatih.

B.3. Kadar air

B.3.1 Prinsip

Bobot yang hilang selama pemanasan dalam oven pada suhu $(102 \pm 2) ^\circ\text{C}$ selama 2 jam. Bobot yang hilang atau kadar air dihitung secara gravimetri.

B.3.2 Peralatan

- a) oven terkalibrasi dengan ketelitian $1 ^\circ\text{C}$;
- b) neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg
- c) desikator yang berisi desikan;
- d) botol timbang dengan penutup;

B.3.3 Cara kerja

- panaskan botol timbang beserta tutupnya dalam oven pada suhu $(102 \pm 2) ^\circ\text{C}$ selama lebih kurang satu jam dan dinginkan dalam desikator selama 45 menit kemudian timbang dengan neraca analitik (botol timbang dan tutupnya) (W_0);
- masukkan 1 g sampai 3 g contoh ke dalam botol timbang, tutup, dan timbang (W_1);
- panaskan botol timbang yang berisi contoh tersebut dalam keadaan terbuka dengan meletakkan tutup botol disamping botol di dalam oven pada suhu $(102 \pm 2) ^\circ\text{C}$ selama dua jam (dua jam setelah suhu oven $102 ^\circ\text{C}$);
- tutup botol timbang ketika masih di dalam oven, pindahkan segera kedalam desikator dan dinginkan selama 45 menit kemudian timbang;
- lakukan pemanasan kembali selama 1 jam dan ulangi kembali sampai perubahan bobot antara pemanasan selama 1 jam mempunyai interval $\leq 2 \text{ mg}$ (W_2);
- lakukan pekerjaan duplo;
- hitung kadar air dalam contoh.

B.3.4 Perhitungan

$$\text{Kadar air} = \frac{W_1 - W_2}{W_1 - W_0} \times 100\%$$

Keterangan:

W_0 adalah bobot botol timbang kosong dan tutupnya, dinyatakan dalam gram (g);

W_1 adalah bobot botol timbang, tutupnya dan contoh sebelum dikeringkan, dinyatakan dalam gram (g);

W_2 adalah bobot botol timbang, tutupnya dan contoh setelah dikeringkan, dinyatakan dalam gram (g).

B.3.5 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 5 % dari nilai rata-rata hasil kadar air atau deviasi (RSD) maksimal 2 %. Jika kisaran lebih besar dari 5 % atau deviasi lebih besar dari 2 % analisis harus diulang kembali.

B.4 Kadar Protein ($N \times 6,38$)**B.4.1 Prinsip**

Contoh uji didestruksi dengan H_2SO_4 menggunakan $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ sebagai katalis dan K_2SO_4 untuk meningkatkan titik didihnya bertujuan melepaskan nitrogen dari protein sebagai garam ammonium. Garam ammonium tersebut diuraikan menjadi NH_3 pada saat destilasi menggunakan NaOH . NH_3 yang dibebaskan diikat dengan asam borat menghasilkan ammonium borat yang secara kuantitatif dititrasi dengan larutan baku asam sehingga diperoleh total nitrogen. Kadar protein susu diperoleh dari hasil kali total nitrogen dengan 6,38.

B.4.2 Perekasi

- asam sulfat, H_2SO_4 pekat bebas nitrogen;
- larutan katalis tembaga, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ bebas nitrogen 0,05 g/ml H_2O ;
larutkan 5 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dengan air suling menjadi 100 ml, lalu pindahkan ke dalam botol bertutup gelas
- katalis selen;

- campurkan 4 g serbuk SeO_2 , 150 g K_2SO_4 atau Na_2SO_4 dan 30 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$
- kalium sulfat, K_2SO_4 bebas nitrogen;
 - batu didih;
 - larutan indikator *methyl red* (MR) / *bromocresol green* (BCG);
larutkan 0,2 g *methyl red* dengan etanol 95 % menjadi 100 ml. Larutkan 1,0 g *bromocresol green* dengan etanol 95 % menjadi 500 ml. Campurkan 1 bagian larutan *methyl red* dan 5 bagian larutan *bromocresol green* dalam gelas piala lalu pindahkan ke dalam botol bertutup gelas.
 - larutan asam borat, H_3BO_3 4 %;
larutkan 40 g H_3BO_3 dengan air suling menjadi 1000 ml dan tambahkan 3 ml larutan indikator *methyl red* / *bromocresol green*, aduk, (larutan akan berwarna kuning terang) dan pindahkan ke dalam botol bertutup gelas.
 - larutan natrium hidroksida, NaOH 30 %;
larutkan 600 g hablur NaOH dengan air suling menjadi 2000 ml, simpan ke dalam botol bertutup karet.
 - larutan indikator fenolftalein (PP) 1 %;
larutkan 1 g serbuk indikator PP dengan alkohol 95 % dan encerkan menjadi 100 ml.
 - larutan asam klorida, HCl 0,1000M.
pipet dengan hati-hati 8,60 ml HCl pekat (36.5 – 38) % ke dalam labu ukur 1 L dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis dan ditetapkan normalitasnya.

B.4.3 Peralatan

- labu Kjeldahl 100 ml;
- distilator dan kelengkapannya;
- pemanas listrik / alat destruksi dilengkapi dengan penghisap asap;
- neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- buret 10 ml terkalibrasi;
- batu didih.

B.4.4 Cara kerja

- timbang 1 g contoh ke dalam labu Kjeldahl, tambahkan 15,00 g K_2SO_4 , 1 ml larutan katalis $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ atau 1 g campuran katalis selen, 8-10 batu didih dan 25 ml H_2SO_4 pekat;
- panaskan campuran dalam pemanas listrik sampai mendidih dan larutan menjadi jernih kehijau-hijauan. Lakukan dalam lemari asam atau lengkapi alat destruksi dengan unit pengisapan asap;
- biarkan dingin, kemudian encerkan dengan air suling secukupnya;
- tambahkan 75 ml larutan NaOH 30 %. (periksa dengan indikator PP sehingga campuran menjadi basa);
- sulingkan selama 5 - 10 menit atau saat larutan destilat telah mencapai kira-kira 150 ml, dengan penampung destilat adalah 50 ml larutan H_3BO_3 4 %;
- bilas ujung pendingin dengan air suling;
- titar larutan campuran destilat dengan larutan HCl 0,1000 M;
- kerjakan penetapan blanko.

B.4.5 Perhitungan

$$\text{Kadar protein (\%)} = \frac{(V_1 - V_2) \times N \times 14,008 \times 6,38}{W} \times 100$$

Keterangan:

V_1 adalah Volume HCl 0,1000 N untuk titrasi contoh, dinyatakan dalam mililiter (ml);

- V_2 adalah Volume HCl 0,1000 N untuk titrasi blanko, dinyatakan dalam ml (ml);
 N adalah Normalitas larutan HCl;
 W adalah bobot contoh, dinyatakan dalam miligram (mg);
 14,008 adalah bobot atom Nitrogen.
 6,38 adalah faktor protein untuk susu.

B.4.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 5 % dari nilai rata-rata hasil kadar protein atau deviasi (*RSD*) maksimal 3 %. Jika kisaran lebih besar dari 5 % atau *RSD* lebih besar dari 3 % analisis harus diulang kembali.

B.5. Kadar gula dihitung sebagai sakarosa

B.5.1 Prinsip

Sakarosa dihidrolisa menjadi gula pereduksi. Jumlah gula pereduksi dapat mereduksi Cu^{2+} menjadi Cu^+ . Kelebihan Cu^{2+} dititrasi dengan cara iodometri. Jumlah Cu^{2+} ditetapkan pada titrasi blanko. Perbedaan antara penitrasi blanko dan contoh dapat dihitung sebagai jumlah gula pereduksi (menggunakan Tabel B.1)

B.5.2 Peralatan

- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- penangas listrik;
- penangas air;
- pendingin tegak;
- termometer;
- stopwatch*;
- erlenmeyer 500 ml terkalibrasi;
- pipet volumetrik 10 ml, 25 ml, dan 50 ml terkalibrasi;
- labu ukur 100 ml, 250 ml, dan 1000 ml terkalibrasi;
- buret 50 ml terkalibrasi; dan
- batu didih.

B.5.3 Pereaksi

- larutan *Luff Schoorl*;
 - larutkan 143,8 g Na_2CO_3 an hidrat dalam kira-kira 300 ml air suling. Sambil diaduk, tambahkan 50 g asam sitrat yang telah dilarutkan dengan 50 ml air suling.
 - tambahkan 25 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ yang telah dilarutkan dengan 100 ml air suling.
 - pindahkan larutan tersebut ke dalam labu ukur 1 liter, tepatkan larutan sampai tanda garis dengan air suling dan kocok.
 - biarkan semalam dan saring bila perlu. Larutan ini mempunyai kepekatan Cu^{2+} 0,2 N dan Na_2CO_3 2 M.
- larutan kalium iodida, KI 20 %;
 larutkan 20 g kalium iodida p.a. dengan air suling hingga 100 ml.
- larutan asam sulfat, H_2SO_4 25 % dan 3 M;
 - H_2SO_4 25 %;
 larutkan 138 ml H_2SO_4 p.a. (98 %, b.j. 1,84) dengan 745 ml air suling.
 - H_2SO_4 3 M;
 larutkan 84 ml H_2SO_4 p.a. (98 %, b.j. 1,84) dengan air suling hingga 1 L.
- larutan natrium tio sulfat, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1 N;
 - larutkan 100 ml larutan natrium tiosulfat 1 N dengan air suling bebas CO_2 menjadi 1 L;
 - pembuatan natrium tiosulfat 1 N;

- larutkan 248 g natrium tiosulfat 5 H₂O dengan air suling bebas CO₂ (yang sudah dididihkan terlebih dahulu) sehingga 1 L.
- standardisasi natrium tiosulfat 0,1 N.
 - e) larutan asam klorida, HCl 25 % dan 4 N;
 - HCl 25 %;

640 mL HCl p.a. (± 37 %, b.j. 1,19) diencerkan dengan air suling hingga 1 L.
 - HCl 4 N;

356 ml HCl p.a. (± 37 %, b.j. 1,19) diencerkan dengan air suling hingga 1 L.
 - f) indikator kanji 0,5 %;

larutkan 0,50 g amilum dengan air panas menjadi 100 ml.
 - g) larutan natrium hidroksida, NaOH 0,1 M;
 - h) larutan indikator fenolftalein 1 %;

larutkan 1 g fenolftalein p.a. dengan alkohol 60 % hingga 100 ml.
 - i) larutan seng asetat, (CH₃COO)₂.2 H₂O 3 N; dan

timbang 55 g Zn asetat 2 H₂O, kemudian larutkan dengan air suling menjadi 100 ml.
 - j) larutan kalium ferisianida, K₄Fe(CN)₆ 0,5 N.

larutkan 5,3 g kalium ferisianida dengan air suling hingga 100 ml.

B.5.4 Cara kerja

- a) Timbang 2 g sampai dengan 3 g contoh (W) dan masukkan ke dalam labu ukur 250 ml, tambahkan air dan kocok;
- b) tambahkan 4 ml Zn asetat dan kocok;
- c) tambahkan 4 ml larutan kalium ferisianida. Apabila tidak timbul endapan berarti penambahan K₄Fe(CN)₆ 0,5 N sudah cukup;
- d) goyangkan dan tepatkan isi labu ukur sampai tanda garis dengan air suling dan kocok, biarkan kira-kira 30 menit dan saring;
- e) pipet 50 ml hasil penyaringan ke dalam labu ukur 100 ml;
- f) tambahkan 5 ml HCl 25 %, hidrolisis dalam penangas air suhu 68 °C sampai dengan 70 °C selama 10 menit (menggunakan *stopwatch*);
- g) angkat labu ukur dan termometer dibilas dengan air dan dinginkan;
- h) pipet 25 ml larutan *Luff Schoorl* ke dalam Erlenmeyer 500 ml tertutup asah, tambahkan 10 ml larutan hasil saringan (dengan menggunakan pipet) dan 15 ml air suling agar volume menjadi 50 ml serta beberapa pasir batu didih;
- i) pemipetan contoh dapat diperkecil dan atau diperbesar tergantung dari kandungan gula pereduksi dalam contoh. Apabila terbentuk endapan merah dan warna biru dari larutan hilang, perkecil pemipetan. Sebaliknya apabila endapan merah tidak terbentuk sama sekali, perbesar pemipetan. Penambahan air diatur sehingga volume akhir 50 ml;
- j) hubungkan Erlenmeyer dengan pendingin tegak, panaskan diatas pemanas listrik, usahakan dalam waktu 3 menit sudah mulai mendidih;
- k) panaskan terus selama 10 menit (pakai *stopwatch*) kemudian angkat dan segera dinginkan dalam bak berisi es (jangan digoyang, apabila warna biru dari larutan *Luff Schoorl* habis, maka pemipetan larutan contoh diperkecil/diulang);
- l) setelah dingin tambahkan 10 ml larutan KI 20% dan 25 ml larutan H₂SO₄ 25 % (hati-hati terbentuk gas CO₂);
- m) titar dengan larutan natrium tio sulfat 0,1 N dan tambahkan 2 ml sampai dengan 3 ml indikator larutan kanji 0,5 % (V₁);
- n) lakukan penetapan blanko, pipet 25 ml larutan *Luff Schoorl* dan tambahkan 25 ml air suling, kerjakan seperti diatas (V₂);
- o) kerjakan penetapan duplo; dan
- p) hitung sakarosa dengan menggunakan Tabel B.1.

B.5.5 Perhitungan

Total gula dihitung sebagai sakarosa (%) = 0.95 x % gula sesudah inversi dengan:

$$\text{Gula sesudah inversi (\%)} = \frac{W_1 \times fp}{W} \times 100 \%$$

Keterangan:

- W_1 adalah bobot glukosa, berdasarkan Tabel B.1, dinyatakan dalam miligram (mg);
 Jumlah natrium tiosulfat 0,1 N yang diperlukan untuk mencari bobot glukosa dalam tabel adalah pengurangan volume titar blanko dengan volume titar contoh (V_2 sampai dengan V_1);
 fp adalah faktor pengenceran;
 W adalah bobot contoh, dinyatakan dalam miligram (mg).

B.5.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 3 % dari nilai rata-rata hasil kadar total gula. Jika kisaran lebih besar dari 3 %, maka analisis harus diulang kembali.

Tabel B.1 - Ekvivalen natrium tiosulfat

Na₂S₂O₃ 0,1 M (ml)	Gula pereduksi Glukosa (mg)
1	2,4
2	4,8
3	7,2
4	9,7
5	12,2
6	14,7
7	17,2
8	19,8
9	22,4
10	25,0
11	27,6
12	30,3
13	33,0
14	35,7

Tabel B.1 (lanjutan)

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1 M (ml)	Gula pereduksi Glukosa (mg)
15	38,5
16	41,3
17	44,2
18	47,1
19	50,0
20	53,0
21	56,0
22	59,1
23	62,2

B.6 Cemarkan logam

B.6.1 Penetapan kadmium (Cd) dan timbal (Pb)

B.6.1.1 Prinsip

Destruksi contoh dengan cara pengabuan kering pada 450 °C yang dilanjutkan dengan pelarutan dalam larutan asam. Logam yang terlarut dihitung menggunakan alat Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) dengan panjang gelombang maksimal 228,8 nm untuk Cd dan 283 nm untuk Pb.

B.6.1.2 Peralatan

- Spektrofotometer Serapan Atom beserta kelengkapannya (lampu katoda Cd dan Pb) terkalibrasi (sebaiknya menggunakan SSA tungku grafit);
- neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- penangas listrik;
- penangas air;
- cawan porselin/platina/kwarsa dengan kapasitas 50 ml sampai dengan 100 ml;
- pipet ukur berskala 0,05 ml atau mikro buret terkalibrasi;
- labu ukur 50 ml, 100 ml, dan 1000 ml, terkalibrasi;
- gelas ukur kapasitas 10 ml;
- gelas piala 250 ml;
- wadah *polypropylene*; dan
- kertas *Whatman* No. 41.

B.6.1.3 Pereaksi

- Larutan asam nitrat, HNO_3 pekat (65 %, Bj 1,4);
- larutan asam klorida, HCl pekat (37 %, Bj 1,19) ;
- larutan asam nitrat, HNO_3 0,1 N;
encerkan 7 ml HNO_3 65 % dengan air suling dalam labu ukur 1000 ml dan encerkan sampai tanda garis.

- d) larutan asam klorida, HCl 6N;
encerkan 500 ml HCl 37 % dengan air suling dalam labu ukur 1000 ml dan encerkan sampai tanda garis.
- e) larutan baku 1000 µg/ml Cd;
larutkan 1,000 g Cd dengan 7 ml HNO₃ pekat dalam gelas piala 250 ml dan masukkan ke dalam labu ukur 1000 ml kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Alternatif lain, bisa digunakan larutan baku Cd 1000 µg/ml siap pakai.
- f) larutan baku 200 µg/ml Cd;
pipet 10 ml larutan baku 1000 µg/ml Cd ke dalam labu ukur 50 ml kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian dikocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 200 µg/ml Cd.
- g) larutan baku 20 µg/ml Cd;
pipet 10 ml larutan baku 200 µg/ml Cd ke dalam labu ukur 100 ml kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian dikocok. Larutan baku ketiga ini memiliki konsentrasi 20 µg/ml Cd.
- h) larutan baku kerja Cd;
pipet ke dalam labu ukur 100 ml masing-masing sebanyak 0 ml, 0,5 ml, 1 ml; 2 ml; 4 ml; 7 ml dan 9 ml larutan baku 20 µg/ml kemudian tambahkan 5 ml larutan HNO₃ 1 N atau HCl 6 N, dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 µg/ml; 0,1 µg/ml; 0,2 µg/ml; 0,4 µg/ml; 0,8 µg/ml; 1,4 µg/ml dan 1,8 µg/ml Cd.
- i) larutan baku 1000 µg/ml Pb;
larutkan 1,000 g Pb dengan 7 ml HNO₃ pekat dalam gelas piala 250 ml dan masukkan ke dalam labu ukur 1000 ml kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Alternatif lain, bisa digunakan larutan baku Pb 1000 µg/ml siap pakai.
- j) larutan baku 50 µg/ml Pb; dan
pipet 5,0 ml larutan baku 1000 µg/ml Pb ke dalam labu ukur 100 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi Pb 50 µg/ml.
- k) larutan baku kerja Pb;
pipet ke dalam labu ukur 100 ml masing-masing sebanyak 0 ml, 0,2 ml; 0,5 ml; 1 ml; 2 ml; 3 ml dan 4 ml larutan baku 50 µg/ml kemudian tambahkan 5 ml larutan HNO₃ 1 N atau HCl 6 N, dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 µg/ml; 0,1 µg/ml; 0,25 µg/ml; 0,5 µg/ml; 1,0 µg/ml; 1,5 µg/ml dan 2,0 µg/ml Pb.

B. 6.1.4 Cara kerja

- a) Timbang 10 g sampai dengan 20 g contoh (m) dengan teliti dalam cawan porselin/platina/kuarsa;
- b) tempatkan cawan berisi contoh uji di atas penangas listrik dan panaskan secara bertahap sampai contoh uji tidak berasap lagi;
- c) lanjutkan pengabuan dalam tanur (450 ± 5) °C sampai abu berwarna putih, bebas dari karbon;
- d) apabila abu belum bebas dari karbon yang ditandai dengan warna keabu-abuan, basahkan dengan beberapa tetes air dan tambahkan tetes demi tetes HNO₃ pekat kira-kira 1 ml sampai dengan 3 ml;
- e) keringkan cawan di atas penangas listrik dan masukkan kembali ke dalam tanur pada suhu (450 ± 5) °C kemudian lanjutkan pemanasan sampai abu menjadi putih. Penambahan HNO₃ pekat dapat diulangi apabila abu masih berwarna keabu-abuan;
- f) larutkan abu berwarna putih dalam 5 ml HCl 6N, sambil dipanaskan di atas penangas listrik atau penangas air sampai kering, kemudian larutkan dengan HNO₃ 0,1 N dan masukkan ke dalam labu ukur 50 ml kemudian tepatkan hingga tanda garis dengan air suling (V), jika perlu, saring larutan menggunakan kertas saring *Whatman* No.41, ke dalam wadah *polypropylene*;

- g) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- h) baca absorbans larutan baku kerja dan larutan contoh terhadap blanko menggunakan SSA pada panjang gelombang maksimum sekitar 228,8 nm untuk Cd dan 283 nm untuk Pb;
- i) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ($\mu\text{g/ml}$) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- j) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C); dan
- k) hitung kandungan logam dalam contoh.

B.6.1.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan logam (mg/kg)} = \frac{C}{m} \times V$$

Keterangan:

C adalah konsentrasi logam dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter ($\mu\text{g/ml}$);

V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam miliiter (ml);

m adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g).

B.6.2 Penetapan timah (Sn)

B.6.2.1 Prinsip

Contoh didekstruksi dengan HNO_3 dan HCl kemudian tambahkan KCl untuk mengurangi gangguan. Sn dibaca menggunakan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) pada panjang gelombang maksimum 235,5 nm dengan nyala oksidasi $\text{N}_2\text{O}-\text{C}_2\text{H}_2$.

B.6.2.2 Peralatan

- a) Spektrofotometer Serapan Atom beserta kelengkapannya (lampu katoda Sn) terkalibrasi;
- b) tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1°C ;
- c) penangas listrik;
- d) penangas air;
- e) neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- f) labu ukur 50 ml, 100 ml, dan 1000 ml, terkalibrasi;
- g) pipet ukur berskala 0,1 ml kapasitas 5 ml dan 10 ml terkalibrasi;
- h) erlenmeyer 250 ml;
- i) gelas ukur kapasitas 50 ml; dan
- j) gelas piala 250 ml.

B.6.2.3 Pereaksi

- a) Larutan kalium klorida, 10 mg/ml K;
larutkan 1,91 g KCl dengan air menjadi 100 ml.
- b) asam nitrat pekat, HNO_3 pekat;
- c) asam klorida pekat, HCl pekat;
- d) larutan baku 1000 mg/l Sn; dan
larutkan 1000 g Sn dengan 200 ml asam HCl pekat dalam labu ukur 1000 ml, tambahkan 200 ml air suling, dinginkan pada suhu ruang dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.

e) larutan baku kerja Sn.

pipet 10 ml HCl pekat dan 1,0 ml larutan KCl ke dalam masing-masing labu ukur 100 ml. Tambahkan masing-masing 0 ml; 0,5 ml; 1,0 ml; 1,5 ml; 2,0 ml dan 2,5 ml larutan baku 1000 mg/L Sn dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 µg/ml; 5 µg/ml; 10 µg/ml; 15 µg/ml; 20 µg/ml dan 25 µg/ml Sn.

B.6.2.4 Cara kerja

- Timbang 10 g sampai dengan 20 g (m) dengan teliti ke dalam Erlenmeyer 250 ml, tambahkan 30 ml HNO₃ pekat dan biarkan 15 menit;
- panaskan perlahan selama 15 menit di dalam lemari asam, hindari terjadinya percikan yang berlebihan;
- lanjutkan pemanasan sehingga sisa volume 3 ml sampai dengan 6 ml atau sampai contoh mulai kering pada bagian bawahnya, hindari terbentuknya arang;
- angkat erlenmeyer dari penangas listrik, tambahkan 25 ml HCl pekat, dan panaskan sampai selama 15 menit sampai letupan dari uap Cl₂ berhenti;
- tingkatkan pemanasan dan didihkan sehingga sisa volume 10 ml sampai dengan 15 ml;
- tambahkan 40 ml air suling, aduk, dan tuangkan ke dalam labu ukur 100 ml, bilas erlenmeyer tersebut dengan 10 ml air suling (V);
- tambahkan 1,0 ml KCl, dinginkan pada temperatur ruang, tera dengan air suling dan saring;
- siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- baca absorbans larutan baku kerja dan larutan contoh terhadap blanko menggunakan SSA pada panjang gelombang maksimum 235,5 nm dengan nyala oksidasi N₂O-C₂H₂;
- buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam (µg/ml) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- lakukan pengerjaan duplo; dan
- hitung kandungan Sn dalam contoh;

B.6.2.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan timah (Sn) (mg/kg)} = \frac{C}{m} \times V$$

Keterangan:

- C adalah konsentrasi timah (Sn) dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter (µg/ml)
 V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (ml);
 m adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g).

B.6.3.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 16 % dari nilai rata-rata hasil kandungan timah (Sn). Jika kisaran lebih besar dari 16 %, maka analisis harus diulang kembali.

B.6.3 Penetapan merkuri (Hg)**B.6.3.1 Prinsip**

Reaksi antara senyawa merkuri dengan NaBH₄ atau SnCl₂ dalam keadaan asam akan membentuk gas atomik Hg. Jumlah Hg yang terbentuk sebanding dengan absorbans Hg

yang dibaca menggunakan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) tanpa nyala pada panjang gelombang maksimum 253,7 nm.

B.6.3.2 Peralatan

- Spektrofotometer Serapan Atom yang dilengkapi lampu katoda Hg dan generator uap hidrida ("HVG");
- neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- penangas listrik;
- pendingin terbuat dari borosilikat, diameter 12 mm sampai dengan 18 mm, tinggi 400 mm diisi dengan cincin Raschig setinggi 100 mm, dan dilapisi dengan batu didih berdiameter 4 mm di atas cincin setinggi 20 mm;
- labu destruksi 250 ml berdasar bulat;
- labu ukur 100 ml, 500 ml, dan 1000 ml terkalibrasi;
- gelas ukur 25 ml; dan
- pipet ukur berskala 0,05 ml atau mikro buret terkalibrasi;

B.6.3.3 Pereaksi

- Asam sulfat, H_2SO_4 9 M;
- asam nitrat, HNO_3 7 M;
- batu didih;
- campuran HNO_3 : HClO_4 (1:1);
- hidrogen peroksida, H_2O_2 ;
- larutan Natrium molibdat 2 %.
- larutan pereduksi;
campurkan 50 ml H_2SO_4 dengan 300 ml air suling dalam gelas piala 500 ml dan dinginkan sampai suhu ruang kemudian tambahkan 15 g NaCl, 15 g hidroksilamin sulfat, dan 25 g SnCl_2 . Pindahkan kedalam labu ukur 500 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- larutan NaBH_4 ;
larutkan 3 g serbuk NaBH_4 dan 3 g NaOH dengan air suling dalam labu ukur 500 ml.
- larutan pengencer;
masukkan 300 ml sampai dengan 500 ml air suling ke dalam labu ukur 1000 ml dan tambahkan 58 ml HNO_3 kemudian 67 ml H_2SO_4 . Encerkan dengan air suling sampai tanda garis dan kocok.
- larutan baku 1000 $\mu\text{g/ml}$ Hg;
larutkan 0,1354 g HgCl_2 dengan kira-kira 25 ml air suling dalam gelas piala 250 ml dan masukkan ke dalam labu ukur 100 ml kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- larutan baku 1 $\mu\text{g/ml}$ Hg; dan
pipet 1 ml larutan baku 1000 mg/l Hg ke dalam labu ukur 1000 ml dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 1 mg/l.
- larutan baku kerja Hg;
pipet masing-masing 0,25 ml; 0,5 ml; 1 ml; dan 2 ml larutan baku 1 mg/l ke dalam labu ukur 100 ml terpisah dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0,0025 $\mu\text{g/ml}$; 0,005 $\mu\text{g/ml}$; 0,01 $\mu\text{g/ml}$; 0,02 $\mu\text{g/ml}$ Hg.

B.6.3.4 Cara kerja**B.6.3.4.1 Pengabuan basah**

- Timbang 5 g contoh (m) dengan teliti ke dalam labu destruksi dan tambahkan 25 ml H_2SO_4 9 M, 20 ml HNO_3 7 M, 1 ml larutan natrium molibdat 2 %, dan 5 butir sampai dengan 6 butir batu didih;
- hubungkan labu destruksi dengan pendingin dan panaskan di atas penangas listrik selama 1 jam. Hentikan pemanasan dan biarkan selama 15 menit;
- tambahkan 20 ml campuran HNO_3 – HClO_4 (1:1) melalui pendingin;
- hentikan aliran air pada pendingin dan panaskan dengan panas tinggi hingga timbul uap putih. Lanjutkan pemanasan selama 10 menit dan dinginkan;
- tambahkan 10 ml air suling melalui pendingin dengan hati-hati sambil labu digoyang-goyangkan;
- didihkan lagi selama 10 menit;
- matikan pemanas dan cuci pendingin dengan 15 ml air suling sebanyak 3 kali kemudian dinginkan sampai suhu kamar;
- pindahkan larutan destruksi contoh ke dalam labu ukur 100 ml secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- pipet 25 ml larutan di atas ke dalam labu ukur 100 ml dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis;
- siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- tambahkan larutan pereduksi ke dalam larutan baku kerja Hg, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat "HVG";
- baca absorbans larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 253,7 nm;
- buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ($\mu\text{g/ml}$) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- lakukan pengerjaan duplo; dan
- hitung kandungan Hg dalam contoh.

B.6.3.4.2 Destruksi menggunakan *microwave* atau destruksi sistem tertutup

- Timbang 1 g contoh (m) ke dalam tabung destruksi dan tambahkan 5 ml HNO_3 , 1 ml H_2O_2 kemudian tutup rapat;
- masukkan ke dalam oven *microwave* dan kerjakan sesuai dengan petunjuk pemakaian alat;
- pindahkan larutan destruksi contoh ke dalam labu ukur 50 ml secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- tambahkan larutan pereduksi ke dalam larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat "HVG";
- baca absorbans larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 253,7 nm;
- buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ($\mu\text{g/ml}$) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- lakukan pengerjaan duplo; dan
- hitung kandungan Hg dalam contoh;

B.6.3.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan merkuri (Hg) (mg/kg)} = \frac{C}{m} \times V \times fp$$

Keterangan:

- C adalah konsentrasi merkuri (Hg) dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter ($\mu\text{g/ml}$);
 V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (ml);
 m adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g);
 fp adalah faktor pengenceran.

B.6.3.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 16 % dari nilai rata-rata hasil kandungan merkuri (Hg). Jika kisaran lebih besar dari 16 %, maka analisis harus diulang kembali.

B.7 Cemarkan arsen (As)

B.7.1 Prinsip

Contoh didestruksi dengan asam menjadi larutan arsen. Larutan As^{5+} direduksi dengan KI menjadi As^{3+} dan direaksikan dengan NaBH_4 atau SnCl_2 sehingga terbentuk AsH_3 yang kemudian dibaca dengan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) pada panjang gelombang 193,7 nm.

B.7.2 Peralatan

- Spektrofotometer Serapan Atom yang dilengkapi dengan lampu katoda As dan generator uap hidrida ("HVG");
- tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- burner* atau *bunsen*;
- pemanas listrik;
- labu Kjeldahl 250 ml;
- labu ukur 50 ml, 100 ml, 500 ml, dan 1000 ml terkalibrasi;
- pipet volumetrik 25 ml;
- cawan porselen kapasitas 50 ml;
- gelas ukur 25 ml;
- pipet ukur berskala 0,05 ml atau mikro buret terkalibrasi; dan
- labu borosilikat berdasar bulat 50 ml.

B.7.3 Pereaksi

- Asam nitrat, HNO_3 pekat;
- asam perklorat, HClO_4 pekat;
- natrium boronhidrida, NaBH_4 ;
larutkan 3 g NaBH_4 dan 3 g NaOH dengan air suling sampai tanda garis dalam labu ukur 500 ml.
- asam klorida, HCl 8 M;
larutkan 66 ml HCl 37 % kedalam labu ukur 100 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.

- e) timah (II) klorida, $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10 %;
timbang 50 g $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ke dalam piala gelas 200 ml dan tambahkan 100 ml HCl 37 %. Panaskan hingga larutan jernih dan dinginkan kemudian tuangkan ke dalam labu ukur 500 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- f) kalium iodida, KI 20 %;
timbang 20 g KI ke dalam labu ukur 100 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (larutan harus dibuat langsung sebelum digunakan).
- g) larutan $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 75 mg/ml;
larutkan 3,75 g MgO dengan 30 ml H_2O secara hati-hati, tambahkan 10 ml HNO_3 , dinginkan dan encerkan hingga 50 ml dengan air suling;
- h) larutan baku 1000 $\mu\text{g/ml}$ As;
larutkan 1,3203 g As_2O_3 kering dengan sedikit NaOH 20 % dan netralkan dengan HCl atau HNO_3 1:1 (1 bagian asam : 1 bagian air). Masukkan ke dalam labu ukur 1 L dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- i) larutan baku 100 $\mu\text{g/ml}$ As;
pipet 10 ml larutan baku arsen 1000 $\mu\text{g/ml}$ ke dalam labu ukur 100 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 100 $\mu\text{g/ml}$ As.
- j) larutan baku 1 $\mu\text{g/ml}$ As; dan
pipet 1 ml larutan standar arsen 100 mg/l ke dalam labu ukur 100 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku ketiga ini memiliki konsentrasi 1 $\mu\text{g/ml}$ As.
- k) larutan baku kerja As;
pipet masing-masing 1,0 ml; 2,0 ml; 3,0 ml; 4,0 ml dan 5,0 ml larutan baku 1 $\mu\text{g/ml}$ As ke dalam labu ukur 100 ml terpisah dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0,01 $\mu\text{g/ml}$; 0,02 $\mu\text{g/ml}$; 0,03 $\mu\text{g/ml}$; 0,04 $\mu\text{g/ml}$ dan 0,05 $\mu\text{g/ml}$ As.

B.7.4 Cara kerja

B.7.4.1 Pengabuan basah

- a) Timbang 5 g sampai dengan 10 g contoh (m) ke dalam labu Kjeldahl 250 ml, tambahkan 5 ml sampai 10 ml HNO_3 pekat dan 4 ml sampai 8 ml H_2SO_4 pekat dengan hati-hati;
- b) setelah reaksi selesai, panaskan dan tambahkan HNO_3 pekat sedikit demi sedikit sehingga contoh berwarna coklat atau kehitaman;
- c) tambahkan 2 ml HClO_4 70 % sedikit demi sedikit dan panaskan lagi sehingga larutan menjadi jernih atau berwarna kuning (jika terjadi pengarangan setelah penambahan asam perklorat, tambahkan lagi sedikit HNO_3 pekat);
- d) dinginkan, tambahkan 15 ml H_2O dan 5 ml amonim oksalat jenuh;
- e) panaskan sehingga timbul uap SO_3 di leher labu;
- f) dinginkan, pindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 50 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- g) pipet 25 ml larutan diatas dan tambahkan 2 ml HCl 8 M, 0.1 ml KI 20 % kemudian kocok dan biarkan minimal 2 menit;
- h) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- i) tambahkan larutan pereduksi (NaBH_4) ke dalam larutan baku kerja As, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat "HVG";
- j) baca absorbans larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 193,7 nm;
- k) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ($\mu\text{g/ml}$) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- l) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);

- m) lakukan pengerjaan duplo; dan
- n) hitung kandungan As dalam contoh.

B.7.4.2 Destruksi menggunakan *microwave* atau destruksi sistem tertutup

- a) Timbang 1 g contoh (m) ke dalam tabung destruksi dan tambahkan 5 ml HNO₃, 1 ml H₂O₂ kemudian tutup rapat.
- b) masukkan ke dalam oven *microwave* dan kerjakan sesuai dengan petunjuk pemakaian alat;
- c) setelah dingin, pindahkan larutan destruksi ke dalam labu ukur 25 ml secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- d) pipet 10 ml larutan destruksi ke dalam labu borosilikat berdasar bulat 50 ml, tambahkan 1 ml larutan Mg(NO₃)₂, Uapkan di atas penangas listrik hingga kering dan arangkan. Abukan dalam tanur dengan suhu (450 °C) (± 1 jam);
- e) dinginkan, larutkan dengan 2,0 ml HCl 8 M, 0.1 ml KI 20 % dan biarkan minimal 2 menit. Tuangkan larutan tersebut ke dalam tabung contoh pada alat;
- f) siapkan NaBH₄ dan HCl dalam tempat yang sesuai dengan yang ditentukan oleh alat;
- g) tuangkan larutan baku kerja As 0,01 µg/ml; 0,02 µg/ml; 0,03 µg/ml; 0,04 µg/ml; 0,05 µg/ml serta blanko ke dalam 6 tabung contoh lainnya. Nyalakan burner serta tombol pengatur aliran pereaksi dan aliran contoh;
- h) baca nilai absorbans tertinggi larutan baku kerja As dan contoh dengan blanko sebagai koreksi;
- i) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi As (µg/ml) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- j) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- k) lakukan pengerjaan duplo; dan
- l) hitung kandungan As dalam contoh.

B.7.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan arsen (As) (mg/kg)} = \frac{C}{m} \times V \times fp$$

Keterangan:

- C adalah konsentrasi arsen (As) dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per miliiliter (µg/ml)
- V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (ml);
- m adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g);
- fp adalah faktor pengenceran.

B.7.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 16% dari nilai rata-rata hasil kandungan arsen (As). Jika kisaran lebih besar dari 16%, maka analisis harus diulang kembali.

B.8 Cemarkan mikroba

B.8.1 Persiapan dan homogenisasi contoh untuk uji Angka Lempeng Total, bakteri *coliform*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, kapang dan khamir

B.8.1.1 Prinsip

Pembebasan sel-sel bakteri yang mungkin terlindung oleh partikel makanan dan untuk mengaktifkan kembali sel-sel bakteri yang mungkin viabilitasnya berkurang karena kondisi yang kurang menguntungkan dalam makanan. Persiapan dan homogenisasi contoh bertujuan agar bakteri terdistribusi dengan baik di dalam contoh makanan yang ditetapkan.

B.8.1.2 Peralatan

- Alat homogenisasi yang sesuai (blender) dengan kecepatan putaran 10.000 rpm sampai dengan 12.000 rpm;
- panas listrik;
- neraca terkalibrasi kapasitas 2000 g dengan ketelitian 0,1 g;
- labu ukur 50 ml, 100 ml, 500 ml, dan 1000 ml terkalibrasi;
- gelas piala steril;
- labu erlenmeyer steril;
- botol pengencer steril;
- pipet volumetrik steril;
- tabung reaksi; dan
- pisau, sendok, gunting, dan spatula steril.

B.8.1.3 Larutan Pengencer

Butterfield's Phosphate-Buffered Dilution Water (BPB);

- | | |
|----------------------------|--------|
| - KH_2PO_4 | 34 g |
| - air suling | 500 ml |

Atur pH dengan NaOH sehingga pH 7,2, tetapkan volume sampai 1000 ml dengan air suling. Sterilisasi pada suhu 121 °C selama 15 menit. Simpan pada refrigerator untuk membuat larutan pengencer 1,25 ml larutan stok diencerkan dengan air destilata sampai volume 1 000 ml, kemudian dimasukkan ke dalam botol pengencer sebanyak 450 ml dan ke dalam tabung reaksi sebanyak (9 ± 1) ml dan disterilisasi pada suhu 121 °C selama 15 menit.

B.8.1.4 Homogenisasi contoh

- Timbang 50 g contoh secara aseptik ke dalam botol pengencer yang telah berisi 450 ml larutan pengencer sehingga diperoleh pengenceran 1:10; dan
- kocok campuran beberapa kali sehingga homogen.

B.8.2 Angka lempeng total (30 °C, 72 jam)

B.8.2.1 Prinsip

Pertumbuhan bakteri mesofil aerob setelah contoh diinkubasikan dalam pembenihan yang sesuai selama 72 jam pada suhu (30 ± 1) °C.

B.8.2.2 Peralatan

- Lemari pengering (inkubator) terkalibrasi;
- oven/alat sterilisasi kering terkalibrasi;
- autoklaf;

- d) alat penghitung koloni (*colony counter*);
- e) penangas air;
- f) pipet ukur 1 ml, 5 ml, dan 10 ml steril; dan
- g) cawan petri gelas/plastik diameter 15 mm x 90 mm steril.

B.8.2.3 Pembenihan dan pengencer

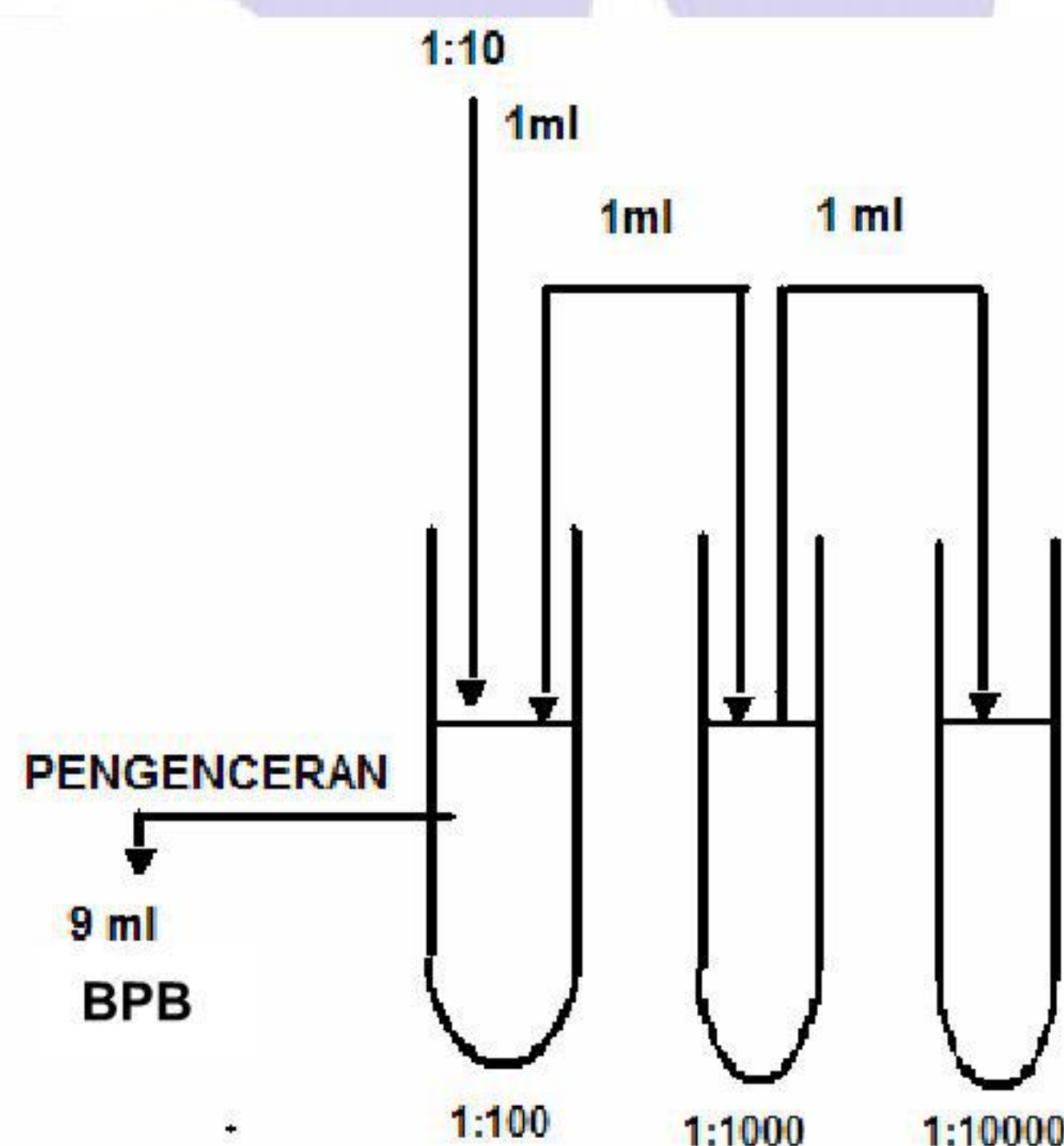
Plate count agar (PCA)

– tryptone	5 g
– yeast extract	2,5 g
– glukosa	1 g
– agar	15 g
– air suling	1000 ml

Larutkan bahan-bahan diatas menjadi 1000 ml dengan air suling dan atur pH menjadi 7,0. Masukkan ke dalam botol. Sterilkan dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

B.8.2.4 Cara kerja

- a) Buat tingkat pengenceran sesuai kebutuhan seperti pada Gambar B.1 dengan menggunakan larutan pengencer BPB;
- b) pipet masing-masing 1 ml dari tingkat pengenceran (F) 10^{-1} sampai dengan 10^{-4} ke dalam cawan petri steril secara duplo;



Gambar B.1 - Tingkat pengenceran menggunakan larutan pengencer BPB

- c) tuangkan 12 ml sampai dengan 15 ml media PCA yang masih cair dengan suhu $(45 \pm 1) ^\circ\text{C}$ ke dalam masing-masing cawan petri;
- d) goyangkan cawan petri dengan hati-hati (putar dan goyang ke depan, ke belakang, ke kanan dan ke kiri) sehingga contoh dan pembenihan tercampur merata dan memadat;
- e) kerjakan pemeriksaan blanko dengan mencampur air pengencer untuk setiap contoh yang diperiksa;
- f) biarkan sampai campuran dalam cawan petri memadat;
- g) masukkan semua cawan petri dengan posisi terbalik ke dalam lemari pengeram pada suhu $30 ^\circ\text{C}$ selama (72 ± 2) jam; dan

- h) catat pertumbuhan koloni (n) pada setiap cawan petri yang mengandung 25 koloni sampai dengan 250 koloni setelah 72 jam;

B.8.2.5 Perhitungan

Angka lempeng total (koloni/g) = $n \times F$

Keterangan:

- n adalah rata – rata koloni dari dua cawan petri dari satu pengenceran, dinyatakan dalam koloni per gram (koloni/g);
F adalah faktor pengenceran dari rata-rata koloni yang dipakai

B.8.2.6 Pernyataan hasil

B.8.2.6.1 Cara menghitung

- pilih cawan petri dari satu pengenceran yang menunjukkan jumlah koloni antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni setiap cawan petri. Hitung semua koloni dalam cawan petri menggunakan alat penghitung koloni. Hitung rata-rata jumlah koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per gram;
- jika salah satu dari dua cawan petri terdapat jumlah koloni lebih kecil dari 25 koloni atau lebih besar dari 250 koloni, hitung jumlah koloni yang terletak antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per gram;

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}
120	25
105	20

$$ALT = \frac{120 + 105 + 25}{[(1 \times 2) + (0,1 \times 1) \times 10^{-2}]} = 124,9375$$

- jika hasil dari dua pengenceran jumlahnya berturut-turut terletak antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni, hitung jumlah koloni dari masing-masing pengenceran koloni per g dengan rumus :

$$ALT = \frac{\sum C}{[(1 \times n_1) + (0,1 \times n_2) \times d]}$$

Keterangan:

- C adalah jumlah koloni dari tiap-tiap petri;
n₁ adalah jumlah petri dari pengenceran pertama yang dihitung;
n₂ adalah jumlah petri dari pengenceran kedua;
d adalah pengenceran pertama yang dihitung;

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}
131	30
143	25

$$ALT = \frac{131 + 143 + 30 + 25}{[(1 \times 2) + (0,1 \times 2) \times 10^{-2}]} = 164,3357$$

- d) jika jumlah koloni dari masing-masing petri lebih dari 25 koloni nyatakan sebagai jumlah bakteri perkiraan;
- jika jumlah koloni per cm^2 kurang dari 100 koloni, maka nyatakan hasilnya sebagai jumlah perkiraan : jumlah bakteri dikalikan faktor pengenceran.

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}	Jumlah bakteri perkiraan
~	640	$1000 \times 640 = 640.000 (6,4 \times 10^5)$

- jika jumlah koloni per cm^2 lebih dari 100 koloni, maka nyatakan hasilnya:
area x faktor pengenceran x 100 contoh rata-rata jumlah koloni 110 per cm^2

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}	area (cm^2)	jumlah bakteri perkiraan
~	7150	65	$> 65 \times 10^3 \times 100 = > 6500.000 (6,5 \times 10^6)$
~	6490	59	$> 59 \times 10^3 \times 100 = > 5900.000 (5,9 \times 10^6)$

- e) jika jumlah koloni dari masing-masing koloni yang tumbuh pada cawan petri kurang dari 25, maka nyatakan jumlah bakteri perkiraan lebih kecil dari 25 koloni dikalikan pengenceran yang terendah; dan
- f) menghitung koloni perambat;
- Perambatan pada koloni ada 3 macam, yaitu :
- merupakan rantai yang tidak terpisah;
 - perambat yang terjadi diantara dasar cawan petri dan pembenihan; dan
 - perambatan yang terjadi pada pinggir atau perukuan pembenihan.
- Jika terjadi hanya satu perambatan (seperti rantai) maka koloni dianggap satu. Jika terbentuk satu atau lebih rantai terbentuk dan berasal dari sumber yang terpisah-pisah, maka uap sumber dihitung sebagai satu koloni.

B.8.2.6.2 Cara menghitung dan membulatkan angka

Dalam melaporkan jumlah koloni atau jumlah koloni perkiraan hanya 2 angka penting yang digunakan, yaitu angka pertama dan kedua (dimulai dari kiri),

- Jika angka ketiga lebih besar dari 5, maka bulatkan ke atas;
contohnya : 528 dilaporkan sebagai 530 penulisannya $5,3 \times 10^2$
- jika angka ketiga kurang dari 5, maka bulatkan kebawah; dan
contohnya : 523 dilaporkan sebagai 520 penulisannya $5,2 \times 10^2$
- jika angka ketiga sama dengan 5, maka bulatkan sebagai berikut:
 - bulatkan ke atas jika angka kedua merupakan angka ganjil; dan
contohnya : 575 dilaporkan sebagai 580 penulisannya $5,8 \times 10^2$
 - bulatkan ke bawah jika angka kedua merupakan angka genap.
contohnya : 565 dilaporkan sebagai 560 penulisannya $5,6 \times 10^2$

B.8.3 Bakteri *coliform* dan *Escherichia coli*

B.8.3.1 Prinsip

Pertumbuhan bakteri *coliform* ditandai dengan terbentuknya gas pada tabung durham, yang diikuti dengan uji biokimia dan selanjutnya dirujuk pada Tabel APM (Angka Paling Mungkin).

B.8.3.2 Peralatan

- Lemari pengering (inkubator) terkalibrasi, $(35 \pm 1) ^\circ\text{C}$;
- penangas air tertutup dengan sistem sirkulasi, $(45,5 \pm 0,2) ^\circ\text{C}$;

- c) rak untuk tabung reaksi;
- d) pipet Mohr 1 ml dan 10 ml berskala steril;
- e) botol pengenceran (± 20 ml) gelas borosilikat yang resistan, dengan sumbat karet atau tutup uliran;
- f) tabung reaksi dan tabung Durham; dan
- g) jarum inokulasi (ose), dengan diameter dalam kira-kira 3 mm.

B.8.3.3 Perbenihan, pengencer dan pereaksi

- a) *lauryl sulfate tryptose* (LST) broth/*lauryl tryptose* (LT) broth; dan
- b) *brilliant green lactose bile* (BGLB) broth 2 %.

B.8.3.4 Cara kerja

B.8.3.4.1 APM - Uji pendugaan untuk bakteri *coliform*

- a) Lakukan persiapan dan homogenisasi contoh seperti pada B.8.1;
- b) inokulasikan masing-masing 1 ml larutan dari setiap tingkat pengenceran (10^{-1} , 10^{-2} dan 10^{-3}) ke dalam tiga tabung *Lauryl sulfate broth*. Pegang pipet sedemikian sehingga ujung bawah pipet menempel pada tabung. Biarkan isi pipet mengalir 2 detik sampai dengan 3 detik. Pipet jangan ditiup untuk mengeluarkan isinya;
- c) masukkan tabung-tabung tersebut ke dalam inkubator pada suhu 35°C selama (48 ± 2) jam;
- d) amati tabung-tabung tersebut pada jam ke- (24 ± 2) . Jika ada tabung yang telah mengandung gas, maka tabung tersebut dinyatakan "positif";
- e) tabung-tabung yang belum mengandung gas dinyatakan "negatif", lanjutkan inkubasi selama 24 jam;
- f) catat adanya pembentukan gas dalam jumlah berapapun setelah inkubasi (48 ± 2) jam karena ini adalah uji pendugaan yang positif untuk bakteri *coliform* untuk tabung-tabung yang negatif; dan
- g) lakukan uji penegasan terhadap semua tabung yang positif untuk uji pendugaan.

B.8.3.4.2 APM - Uji penegasan untuk bakteri *coliform*

- a) Kocok tabung LST yang positif secara hati-hati dengan cara memutar-mutar tabung;
- b) pindahkan satu mata Ose dari setiap tabung LST yang positif ke dalam tabung BGLB 2 % yang berlainan;
- c) masukkan tabung-tabung BGLB 2 % ke dalam inkubator pada suhu 35°C selama (48 ± 2) jam;
- d) catat semua tabung BGLB yang positif menghasilkan gas dan dengan menggunakan Tabel B.2, tentukan APM berdasarkan jumlah tabung BGLB yang memperlihatkan pembentukan gas dalam jumlah berapapun, selama (48 ± 2) jam pada 35°C ; dan
- e) laporkan sebagai APM bakteri *coliform* per gram.

B.8.3.4.3 Uji penegasan *Escherichia coli*

- a) Kocok Tabung LST yang positif secara hati-hati dengan cara memutar-mutar tabung;
- b) Pindahkan satu mata Ose dari setiap tabung LST yang positif ke dalam tabung EC broth yang berlainan;
- c) Inkubasikan tabung-tabung EC tersebut ke dalam penangas air yang bersikulasi, selama (48 ± 2) jam pada $(45,5 \pm 0,2)^{\circ}\text{C}$. Penangas air dipertahankan supaya tetap bersih, tertutup dan dengan tinggi permukaan air di atas permukaan tertinggi media dalam tabung;

- d) Periksa tabung EC tersebut pada jam ke-(48 ± 2) jika telah terbentuk gas dalam jumlah berapapun maka tabung tersebut dinyatakan "positif";
- e) Kocok tabung-tabung EC yang positif secara hati-hati;
- f) Digoreskan/ditanamkan pada satu cawan agar L-EMB, sedemikian rupa hingga dihasilkan koloni yang terpisah-pisah dengan jarak minimum 0,5 cm
- g) Inkubasikan pinggan L-EMB tersebut selama 18 jam sampai 24 jam pada (35 ± 1) °C;
- h) Periksa pinggan - pinggan terhadap adanya koloni yang berwarna coklat dengan atau tanpa kilat logam;
- i) Dari tiap pinggan L - EMB, ambil dengan jarum, paling sedikit 2 koloni yang mencurigakan yang letaknya terpisah dan pindahkan pada tabung agar miring PCA untuk digunakan sebagai inokulum pada uji biokimia;
- j) Tabung-tabung agar miring dari koloni yang dicurigai ini diinkubasikan selama 18 jam sampai 24 jam pada 35 °C. Buatlah pewarnaan Gram dari tiap biakan, E coli adalah Gram negatif dan berbentuk batang tak berspora;
- k) Uji sifat - sifat biokimia dengan menggunakan reaksi-reaksi IMVIC.

Pembentukan indol

- Inokulasi tabung tryptone broth.
- Inkubasi selama (24 ± 2) jam pada 35 °C.
- Uji adanya indol dengan menambahkan 0,2 ml sampai 0,3 ml pereaksi Kovacs'.
- Uji ini positif bila lapisan atas berwarna merah.

Reaksi *Voges Proskauer* dan *Methyl red*

- Inokulasi tabung medium MR - VP dari setiap tabung PCA dan inkubasikan selama (48 ± 2) jam pada 35 °C.
- Secara aseptis pindahkan 1 ml biakan tabung reaksi steril.
- Tambahkan 0,6 ml larutan 5 % alfa naftol dalam alkohol, 0,2 ml larutan KOH 40 % dan beberapa butir kristal kreatin.
- Uji Voges Proskauer adalah positif bila terbentuk warna eosin merah muda dalam waktu 2 jam.
- Tabung medium MR - VP yang semula, diinkubasikan kembali selama 48 jam pada 35 °C.
- Tambahkan 5 tetes indikator methyl red pada setiap tabung.
- Biakan dianggap MR positif bila terjadi warna merah, MR negatif bila kuning.

Penggunaan Sitrat

- Dengan hati - hati tabung Koser's citrate medium diinokulasi dengan menggunakan jarum lurus sedemikian rupa sehingga hanya mengenai permukaan medium. Terlalu banyak inokulasi dapat menyebabkan terbawanya zat - zat lain.
- Inkubasikan selama 96 jam pada suhu 35 °C.
- Adanya pertumbuhan dalam tabung menandakan uji yang positif (perubahan warna dari hijau ke biru).

Pembentukan gas dari Lactose

- Inokulasikan tabung kaldu LST dari setiap agar miring PCA. Inkubasikan selama (48 ± 2) jam pada suhu 35 °C.
- Periksa tabung tabung itu terhadap adanya pembentukan gas.

B.8.3.5 Klasifikasi dan laporan

Tabel B.2 - Reaksi biokimia *E. coli* pada uji IMVIC

Jasad	Indol	Methyl Red	Voges Proskauer	Citrate
Escherichia Coli				
Varitas I	+	+	-	-
Varitas II	-	+	-	-

Klasifikasikan sebagai *E. coli* apabila uji IMVIC adalah + + - - atau - + - -, pewarnaan Gram menunjukkan Gram negatif bentuk batang tidak bersepora atau coccus yang membentuk gas dalam kaldu LST dengan waktu inkubasi (48 ± 2) jam pada suhu 35°C .

Hitunglah APM *E. coli* dengan menggunakan tabel APM berdasarkan jumlah tabung - tabung dari 3 seri pengenceran yang telah dipastikan mengandung *E. coli*.

Tabel B.3 - APM per 1 g contoh bila menggunakan 3 tabung untuk setiap tingkat pengenceran 0,1; 0,01; dan 0,001 g/ml contoh

Tabung yang positif			APM	Tabung yang positif			APM
0,1	0,01	0,001		0,1	0,01	0,001	
0	0	0	< 3	2	2	0	21
0	0	1	3	2	2	1	28
0	1	0	3	2	2	2	35
0	1	1	6	2	3	0	29
0	2	0	6	2	3	1	36
0	3	0	9	3	0	0	23
1	0	0	4	3	0	1	39
1	0	1	7	3	0	2	64
1	0	2	11	3	1	0	43
1	1	0	7	3	1	1	75
1	1	1	11	3	1	2	120
1	2	0	11	3	1	3	160
1	2	1	15	3	2	0	93
1	3	0	16	3	2	1	150
2	0	0	10	3	2	2	216
2	0	1	14	3	2	3	290
2	0	2	20	3	3	0	240
2	1	0	15	3	3	1	460
2	1	1	20	3	3	2	1100
2	1	2	27	3	3	3	> 1100

B.8.4 *Salmonella sp.*

B.8.4.1 Prinsip

Contoh yang diuji ditumbuhkan terlebih dahulu pada media pengkayaan dan kemudian ditumbuhkan pada media selektif. Selanjutnya contoh dideteksi dengan menumbuhkannya pada media agar selektif. Koloni-koloni yang diduga *Salmonella sp.* pada media selektif kemudian diisolasi dan dilanjutkan dengan konfirmasi melalui uji biokimia dan uji serologi untuk meyakinkan ada atau tidaknya bakteri *Salmonella sp.*.

B.8.4.2 Peralatan

- a) Inkubator 35 °C;
- b) autoklaf;
- c) oven;
- d) penangas air;
- e) neraca terkalibrasi kapasitas 2000 g dengan ketelitian 0,1 g;
- f) bunsen;
- g) cawan petri 90 mm -100 mm dan 140 mm -150 mm;
- h) botol pengencer 1000 ml;
- i) gelas ukur 10 ml dan 100 ml;
- j) pipet 10 ml;
- k) pipet tetes;
- l) gelas sediaan;
- m) tabung reaksi;
- n) pengaduk gelas;
- o) jarum ose (inokulasi); dan
- p) kertas pH.

B.8.4.3 Perbenihan dan pereaksi

- a) Media *Rappaport-Vassiliadis* (RV) (media RV harus terbuat dari individual ingredien, bukan formulasi komersial);
- b) *tetrathionate broth* (TT broth) (dengan *iodine* dan *brilliant green*);
- c) *xylose lysine desoxycholate broth* (XLD);
- d) *hektoen enteric* (HE) agar;
- e) *bismuth sulfite* (BS) agar;
- f) *triple sugar iron* (TSI) agar;
- g) *buffered glucose broth* (MR-VP medium);
- h) *urea agar*;
- i) *brilliant green dye solution* 1 %;
- j) air destilata steril;
- k) pereaksi indol dan pembenihan indol;
- l) *lysin decarboxylation medium* (LDC);
- m) *nutrient agar*;
- n) *reagen kovacs*;
- o) *polyvalent somatic (o) test*;
- p) *polyvalent flagellar (h) test*;
- q) 1 N HCl;
- r) 1 N NaOH;
- s) larutan *physiological saline* 0,85 %;
- t) larutan *potassium hydroxide* 40 %;
- u) larutan *formalized physiological saline*;
- v) *rapid urea broth*;
- w) *mac conkey agar*;
- x) *simmon citrate agar*;
- y) *triptone broth*;
- z) *lactose broth*;
- aa) *trypticase (tryptic) soy broth*;
- bb) *trypticase soy-tryptose broth*;
- cc) *malonate broth*;
- dd) *lysin iron agar*;
- ee) *potassium cyanide* (KCN) broth;
- ff) *phenol red carbohydrate broth*;

- gg) *purple carbohydrate broth*;
- hh) *brain heart infusion (BHI) broth*;
- ii) *tryptose blood agar base*; dan
- jj) *bromocresol purple dye solution*, 0,2 %.

B.8.4.4 Cara Kerja

B.8.4.4.1 Homogenisasi contoh dan pra-pengkayaan

- a) Timbang 25 g contoh ke dalam blender yang steril dan tambahkan 225 ml *reconstitute non fat dry milk* steril. Kocok selama 2 menit;
- b) pindahkan secara aseptik ke dalam botol pengencer 500 ml dan biarkan pada suhu ruang selama (60 ± 5) menit dengan wadah tertutup. Kocok perlahan dan atur pH sampai $(6,8 \pm 0,2)$;
- c) tambahkan 0,45 ml larutan *brilliant green dye* 1 %, kocok hingga tercampur merata; dan
- d) kendurkan tutup wadah secukupnya $1/4$ putaran. Inkubasikan selama (24 ± 2) jam pada 35°C .

B.8.4.4.2 Pengkayaan (*enrichment*)

- a) Kencangkan tutup wadah dan kocok secara perlahan contoh yang telah selesai diinkubasi;
- b) pipet 0,1 ml biakan pra-pengkayaan kedalam 10 ml media *Rappaport-Vassiliadis (RV)* dan 1 ml biakan pra-pengkayaan lainnya ke dalam 10 ml *tetrathionate broth* (TTB) dan vortex masing-masing campuran tersebut; dan
- c) inkubasikan media RV pada suhu $(42 \pm 0,2)^\circ\text{C}$ selama (24 ± 2) jam dan TTB pada $(35 \pm 2,0)^\circ\text{C}$ selama (24 ± 2) jam dalam penangas air bersirkulasi.

B.8.4.4.3 Penanaman pada pembenihan pilihan/selektif

- a) Kocok contoh yang telah diinkubasi dan dengan menggunakan jarum ose, goreskan sepanjang 3 mm biakan pengkayaan TTB ke dalam cawan petri yang berisi media XLD, HE dan BS agar. Siapkan BS agar sehari sebelum digunakan dan simpan ditempat gelap pada suhu ruang sampai siap digores.
- b) ulangi cara di atas dari media pengkayaan RV;
- c) inkubasikan cawan-cawan BSA, HE dan XLD selama (24 ± 2) jam pada suhu (35°C) ;
- d) amati kemungkinan adanya koloni *Salmonella sp.*
Morfologi koloni mempunyai ciri-ciri sebagai berikut:
Ambil 2 atau lebih koloni *Salmonella sp.* dari masing-masing media agar selektif setelah (24 ± 2) jam inkubasi. Koloni-koloni *Salmonella sp.* adalah sebagai berikut:
XLD : koloni berwarna merah jambu (pink) dengan atau tanpa inti hitam. Kebanyakan *Salmonella sp.* membentuk koloni besar, inti hitam mengkilap atau mungkin nampak hampir semuanya berwarna hitam. Beberapa kultur *Salmonella sp.* memproduksi koloni kuning dengan atau tanpa inti hitam pada media XLD dan HE.
HE : koloni berwarna hijau kebiruan sampai biru dengan atau tanpa inti hitam. Kebanyakan *Salmonella sp.* membentuk koloni besar, inti hitam mengkilat atau mungkin nampak hampir semuanya berwarna hitam.
BS : koloni berwarna coklat, abu-abu sampai hitam dan kadang-kadang kilap logam. Jika masa inkubasi bertambah maka warna media disekitar koloni mula-mula coklat kemudian menjadi hitam. Pada beberapa strain koloni berwarna hijau dengan atau tanpa warna gelap disekitar media.
- e) jika tidak ada koloni yang khas atau koloni tersangka pada media BSA setelah inkubasi (24 ± 2) jam, jangan mengambil koloni tapi inkubasi kembali media selama

- (24 ± 2) jam. Jika tidak ada koloni yang khas atau koloni tersangka pada media BSA setelah inkubasi (48 ± 2) jam, ambil 2 atau lebih koloni yang tidak khas;
- f) dengan menggunakan jarum inokulasi steril, ambil secara hati-hati bagian tengah koloni dan inokulasikan kedalam media TSI agar miring dengan cara menggores agar miring dan menusuk agar tegak. Tanpa mengambil koloni baru, gunakan jarum yang sama untuk menginokulasikan media LIA dengan cara menusuk agar tegak lebih dahulu, setelah itu goreskan pada agar miring. Karena *reaksi Lysine decarboxylase* sangat anaerobik, LIA miring harus mempunyai tusukan yang dalam (4 cm). Simpan media agar selektif yang telah diambil koloni pada suhu (5 - 8)°C;
 - g) inkubasi TSI dan LIA pada suhu 35 °C selama (24 ± 2) jam dengan membiarkan tutup sedikit kendur untuk mencegah terbentuknya H₂S yang berlebihan. Pada TSI, kultur *Salmonella sp.* yang khas memberikan reaksi alkalin (merah) pada goresan dan asam (kuning) pada tusukan, dengan atau tanpa H₂S (warna kehitaman pada agar). Pada LIA kultur *Salmonella sp.* yang khas memberikan reaksi alkalin (ungu) pada keseluruhan tabung. Reaksi yang benar-benar kuning pada tusukan dinyatakan sebagai kultur negatif. Jangan hanya melihat perubahan warna pada tusukan untuk menyatakan kultur negatif. Umumnya kultur *Salmonella sp.* membentuk H₂S pada agar miring LIA; Beberapa kultur non *Salmonella sp.* membentuk reaksi merah bata pada agar miring LIA;
 - h) semua biakan yang memberikan reaksi alkalin pada bagian tusukan didalam media LIA tanpa memperhatikan reaksi TSI akan potensial sebagai *Salmonella sp.* dan dilakukan uji biokimia dan serologi. Kultur yang memberikan reaksi asam pada tusukan pada media LIA dan alkalin pada goresannya dan reaksi asam pada tusukan di TSI harus dipertimbangkan juga sebagai potensial *Salmonella sp.* dan harus dilakukan uji biokimia dan serologi. Kultur yang memberikan reaksi asam pada tusukan di media LIA dan asam pada goresannya, dan reaksi asam pada tusukannya di media TSI dapat dinyatakan sebagai bukan *Salmonella sp.*. Bila kultur TSI tidak menunjukkan reaksi khas *Salmonella sp.* (alkalin pada goresan dan asam pada tusukan), ulangi lagi pengujian dengan mengambil koloni yang mencurigakan dari medium selektif yang tidak memberikan kultur duga positif dan inokulasi dengan menggores media TSI dan LIA seperti cara mulai pasal f di atas; dan
 - i) lakukan uji identifikasi biokimia dan serologi terhadap:
 - tiga kultur presumtif TSI dari 1 set media selektif (HE, XLD dan BSA) yang diinokulasi dari TTB, dan tiga kultur presumtif yang diinokulasikan dari RV; dan
 - jika tiga kultur presumtif positif TSI tidak terisolasi dari 1 set media selektif, uji presumtif positif TSI dari media agar yang lain. Uji sedikitnya 6 kultur TSI untuk setiap 25 g contoh makanan.

B.8.4.5 Identifikasi *Salmonella sp.*

B.8.4.5.1 Kultur campuran

- a) Apabila kultur TSI agar terlihat tercampur, maka goreskan kembali ke dalam media *MacConkey agar*, HE atau XLD. Inkubasi selama (24 ± 2) jam pada suhu 35 °C. Amati koloni yang diduga *Salmonella sp.* :
 - *Mac Conkey agar*. Koloni yang khas tampak transparan dan tidak berwarna, kadang-kadang dengan inti hitam. Koloni-koloni *Salmonella sp.* akan membentuk area yang terang akibat pengendapan bakteri lain yang kadang-kadang tumbuh;
 - *Hektoen Enteric* (HE) agar. Koloni-koloni hijau kebiruan sampai biru dengan atau tanpa inti hitam. Pada umumnya kultur *Salmonella sp.* membentuk koloni besar, inti hitam mengkilat atau hampir seluruh koloni terlihat berwarna hitam; dan
 - *Xylose Lysine desoxycholate* (XLD) agar. Koloni merah jambu (*pink*) dengan atau tanpa inti hitam. Pada umumnya kultur *Salmonella sp.* membentuk koloni besar, inti hitam mengkilat atau hampir seluruh koloni terlihat berwarna hitam.

- b) pindahkan sedikitnya 2 koloni terduga *Salmonella sp.* pada media TSI dan LIA seperti pada pasal B.8.4.4.3.f dan lanjutkan seperti pada pasal B.8.4.4.3.g.

B.8.4.5.2 Kultur murni

- a) Uji urease (konvensional); dan
Inokulasikan dari TSI yang diduga *Salmonella sp.* dengan jarum inokulasi ke dalam *Urea broth*. Inkubasikan selama (24 ± 2) jam pada suhu 35°C ; dan
- b) uji urease (cepat).
Inokulasikan dari TSI yang diduga *Salmonella sp.* dengan jarum inokulasi ke dalam *rapid urea Broth*. Inkubasikan 2 jam dalam penangas air pada suhu $(37 \pm 0,5)^{\circ}\text{C}$. Reaksi *Salmonella sp.* yang khas untuk uji urease memberikan hasil negatif (tidak terjadi perubahan warna).

B.8.4.5.3 Pengujian kultur urease negatif

- a) *Lysine Decarboxylase Broth* (LDB);
Uji ini dilakukan hanya jika reaksi LIA meragukan. Ambil 1 ose dari TSI dan inokulasikan kedalam media LDB. Kendurkan tutupnya dan inkubasi selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C , tetapi amati setelah 24 jam. *Salmonella sp.* memberikan reaksi alkalin ditandai dengan warna ungu pada seluruh media. Reaksi negatif ditunjukkan dengan warna kuning pada seluruh media. Jika hasil reaksi tidak menunjukkan warna kuning atau ungu tambahkan beberapa tetes 0,2 % *bromocresol purple dye* dan amati perubahan warnanya.
- b) *Phenol red dulcitol* atau *purple broth base* dengan 0,5 % *dulcitol*; dan
inokulasi media *dulcitol broth* dari biakan TSI. Kendurkan tutupnya dan inkubasi selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C yang amati setelah 24 jam. Pada umumnya *Salmonella sp. sp.* memberikan hasil positif yang ditandai dengan pembentukan gas dalam tabung durham dan pH asam (kuning) pada media. Reaksi negatif ditandai dengan tidak terbentuknya gas pada tabung durham dan warna merah (*phenol red* sebagai indikator) atau ungu (*bromocresol purple* sebagai indikator) pada seluruh media.
- c) *Tryptone (tryptophane) broth* (TB);
Inokulasi media *tryptone broth* dari biakan TSI. Inkubasikan selama 24 jam pada suhu 35°C dan selanjutnya ikuti prosedur di bawah ini:
- *Potasium Cyanida* (KCN) *broth*
Pindahkan 1 sengkeli biakan dari TB 24 jam kedalam media KCN *broth*. Tutup tabung rapat-rapat dan lapiasi dengan kertas parafilm. Inkubasikan selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C tetapi amati setelah 24 jam. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya pertumbuhan (ditandai dengan adanya kekeruhan). Umumnya *Salmonella sp.* tidak tumbuh pada media ini dengan ditandai dengan tidak terjadinya kekeruhan.
 - *Malonate broth*
Pindahkan 1 sengkeli dari biakan TB kedalam media *Malonate broth*. Inkubasikan selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C , tetapi amati setelah 24 jam. Kadang-kadang tabung *Malonate broth* yang tidak diinokulasi berubah menjadi biru. Oleh karena itu gunakan *Malonate broth* sebagai kontrol. Reaksi positif ditandai dengan perubahan warna menjadi biru. Umumnya *Salmonella sp.* memberikan reaksi negatif (hijau atau tidak ada perubahan warna) pada *broth* ini.
 - Uji indol
Dari media TB yang tersisa, tambahkan 0,2 ml sampai dengan 0,3 ml pereaksi kovacs'. Amati segera setelah penambahan reagen. Reaksi positif ditandai dengan terbentuknya cincin merah pada permukaan media. Umumnya *Salmonella sp.* memberikan reaksi negatif (tidak terbentuk cincin merah pada permukaan media). Reaksi yang warnanya berada antara jingga dan merah muda dinyatakan sebagai positif.

Nyatakan kultur sebagai bukan *Salmonella* sp. bila reaksi indol positif dan *flagellar* (H) negatif, atau KCN positif dan LDB negatif;

B.8.4.5.4 Uji serologi *polyvalent flagellar* (H)

- a) Inokulasi dari masing-masing TSI agar yang memberikan reaksi urease negatif kedalam:
 - *BHI broth*, dan inkubasi selama 4 jam sampai dengan 6 jam pada suhu 35 °C sampai terlihat pertumbuhan (untuk diuji pada hari yang sama); atau
 - *Trypticase Soy Trypticase broth* (TSTB) dan inkubasi selama (24 ± 2) jam pada suhu 35 °C (untuk diuji hari berikutnya). Tambahkan 2,5 ml larutan *formanilized physiological saline* ke dalam 5 ml kultur di atas.
- b) siapkan 2 kultur dari TSI (contoh dan kontrol) yang telah diberi *formanilized physiological saline* dan uji dengan *Salmonella* sp. *polyvalent flagellar* (H) antisera. Masukkan ±0,5 ml larutan *saline Salmonella* sp. *polyvalent flagellar* (H) antisera dalam tabung serologi 10 mm x 75 mm atau 13 mm x 100 mm. Tambahkan 0,5 ml antigen yang akan diuji. Siapkan kontrol *saline* dengan mencampur 0,5 ml *formanilized physiological saline* dengan 0,5 ml *formanilized* antigen. Inkubasikan campuran tersebut dalam penangas air pada suhu 48 °C) sampai dengan 50 °C. Amati setiap interval waktu 15 menit dan amati hasilnya dalam 1 jam, sebagai berikut:
 - Positif apabila terjadi penggumpalan dalam uji campuran dan tidak ada penggumpalan dalam kontrol;
 - negatif apabila tidak ada penggumpalan dalam uji campuran dan dalam kontrol; dan
 - non spesifik terjadi penggumpalan dalam uji campuran dan kontrol.

B.8.4.5.5 Uji serologi *polyvalent somatic* (o)

- a) Dengan menggunakan pensil lilin, buat garis empat persegi-panjang berukuran 1 cm x 2 cm di atas kaca atau cawan petri plastik berukuran 15 mm x 100 mm atau di atas gelas sediaan;
- b) emulsikan biakan dari TSI miring umur 24 jam sampai dengan 48 jam dengan 2 ml 0,85% *saline* menggunakan ose (dapat juga menggunakan biakan dari *tryptose blood agar base* tanpa darah);
- c) tambahkan 1 tetes suspensi biakan di atas masing-masing bagian empat-persegi panjang yang telah diberi tanda dengan pensil lilin;
- d) tambahkan 1 tetes larutan *saline* pada bagian pertama dan tambahkan 1 tetes *polyvalent somatic* (o) antiserum ke dalam bagian yang lain;
- e) campurkan atau homogenkan bagian atas menggunakan ose yang bersih dan steril selama 1 menit; dan
- f) klasifikasi tes *polyvalent somatic* (o) menunjukkan hasil sebagai berikut:
 - Positif : terjadi penggumpalan didalam pencampuran tes, pada kontrol *saline* tidak terjadi penggumpalan;
 - negatif : tidak terjadi penggumpalan didalam pencampuran tes, dan kontrol *saline*; dan
 - non spesifik : terjadi penggumpalan didalam pencampuran tes dan pada kontrol *saline*.

B.8.4.5.6 Uji biokimia tambahan

Nyatakan sebagai *Salmonella* sp., kultur yang memberikan reaksi yang khas seperti pada Tabel B.3. Jika 1 kultur TSI dari setiap 25 g contoh menunjukkan *Salmonella* sp., uji biokimia tambahan tidak diperlukan. Kultur yang memberikan reaksi positif pada uji serologi *flagellar* (H) tapi tidak menunjukkan karakteristik *Salmonella* sp. pada uji biokimia, harus dimurnikan seperti pada pasal B. 4.5.1 diatas dan uji kembali pada pasal B. 4.5.2

Lakukan uji tambahan berikut ini terhadap kultur yang tidak memberikan reaksi yang khas seperti Tabel B.3 :

- a) *Phenol red lactose* atau *purple lactose broth*;
 - inokulasi *broth* ini dengan kultur TSI agar miring yang telah diinkubasi selama 24 jam sampai 48 jam. Inkubasi selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C , tetapi amati setelah 24 jam;
 - nyatakan positif, apabila terjadi pembentukan asam (kuning) dan gas pada tabung durham. Apabila hanya terjadi pembentukan asam, maka dapat dinyatakan positif. Umumnya *Salmonella sp.* memberikan hasil negatif, ditunjukkan dengan tidak terbentuknya gas pada tabung durham dan warna merah (*phenol red* sebagai indikator) atau ungu (*bromocresol purple* sebagai indikator) pada seluruh media;
 - jika kultur memberikan reaksi *lactose* positif, maka nyatakan sebagai bukan *Salmonella sp.*, kecuali kultur yang memberikan reaksi asam pada agar miring TSI dan reaksi alkalin pada LIA atau reaksi positif pada *malonate broth*.
- b) *Phenol red sucrose* atau *purple sucrose broth*;

Ikuti prosedur seperti pada B.4.5.6.a. Nyatakan sebagai bukan *Salmonella sp.* pada kultur yang memberikan reaksi positif, kecuali kultur yang memberikan reaksi asam pada agar miring TSI dan reaksi positif (alkalin) pada LIA;
- c) *Methyl Red-Voges-Proskauer* (MR-VP) *broth*; dan

Inokulasi medium dengan sedikit biakan TSI agar miring dan inkubasikan selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C ;

Lakukan uji *Voges-Proskauer* (VP) pada suhu ruang sebagai berikut :

 - Pindahkan 1 ml MR-VP *broth* yang telah diinkubasi selama (48 ± 2) jam kedalam tabung reaksi steril dan inkubasikan kembali MR-VP *broth* selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C ;
 - Tambahkan 0,6 ml *alpha naftol* dan aduk;
 - Tambahkan 0,2 ml larutan KOH 40 % dan aduk kembali. Untuk mempercepat reaksi tambahkan sedikit kristal kreatin dan amati hasilnya setelah 4 jam; dan
 - Perubahan warna menjadi merah bata sampai merah delima pada media menunjukkan reaksi positif. Umumnya *Salmonella sp.* memberikan reaksi VP negatif.

Uji merah metil (MR)

 - Tambahkan 5 tetes indikator merah metil kedalam media MR-VP yang telah diinkubasi selama 96 jam;
 - amati hasilnya dengan segera; dan
 - umumnya *Salmonella sp.* memberikan reaksi positif, ditandai dengan terjadinya difusi warna merah pada media. Terjadinya warna kuning menunjukkan reaksi negatif.

Nyatakan sebagai bukan *Salmonella sp.* kultur yang memberikan reaksi KCN dan VP positif serta MR negatif.
- d) *Simmons citrate agar*.
 - Inokulasi medium dengan menggunakan jarum yang mengandung biakan dari TSI agar miring, dengan cara menggores agar miring. Inkubasikan selama (96 ± 2) jam pada suhu 35°C ;
 - nyatakan positif apabila terjadi pertumbuhan yang biasanya diikuti dengan perubahan warna dari hijau menjadi biru. Umumnya *Salmonella sp.* memberikan hasil sitrat positif; dan
 - negatif apabila tidak ada atau sedikit sekali pertumbuhan dan tidak terjadi perubahan warna.

B.8.4.5.7 Pernyataan hasil

Laporkan sebagai *Salmonella sp.* kultur-kultur yang mempunyai reaksi seperti pada Tabel B.4. Laporkan sebagai bukan *Salmonella sp.* kultur-kultur yang memberikan reaksi seperti pada Tabel B.5. Bila tidak ada 1 kultur TSI yang menunjukkan reaksi *Salmonella sp.* pada uji biokimia, lakukan uji biokimia mulai dari pasal B.8.4.5.3 terhadap kultur yang memberikan reaksi urease negatif dari contoh yang sama.

Tabel B.4 - Reaksi biokimia dan serologi untuk *Salmonella* sp.

No.	Test substrat	Hasil reaksi		<i>Salmonella</i> sp. reaksi species ^a
		Positif	Negatif	
1.	<i>Glucose</i> (TSI)	tusukan kuning	tusukan merah	+
2.	<i>Lysine Decarboxylase</i> (LIA)	tusukan ungu	tusukan kuning	+
3.	H ₂ S (TSI dan LIA)	hitam	tidak hitam	+
4.	Urease	warna ungu sampai merah	tidak ada perubahan warna	-
5.	<i>Lysine Decarboxy Broth</i>	warna ungu	warna kuning	+
6.	<i>Phenol Red Dulcitol Broth</i>	warna kuning dan/atau gas	tanpa/ tidak berbentuk gas, tidak berubah warna	+ ^b
7.	KCN broth	pertumbuhan	tidak ada pertumbuhan	-
8.	<i>Malonate broth</i>	warna biru	tidak berubah warna	- ^c
9.	<i>Indol test</i>	permukaan warna nila	permukaan warna kuning	-
10.	<i>Polyvalent flagellar test</i>	penggumpalan	tidak penggumpalan	+
11.	<i>Polyvalent somatic test</i>	penggumpalan	tidak penggumpalan	+
12.	<i>Phenol red lactose broth</i>	warna kuning dan/atau gas	tidak berbentuk gas dan tidak berubah warna	- ^c
13.	<i>Phenol red sucrose broth</i>	warna kuning dan/atau gas	tidak berbentuk gas dan tidak berubah warna	-
14.	<i>Voges-proskauer test</i>	merah muda sampai merah	tidak berubah warna	-
15.	<i>Methyl red test</i>	merah menyebar	kuning menyebar	+
16.	<i>Simmons Citrate</i>	pertumbuhan, warna biru	tidak ada pertumbuhan dan perubahan warna	V

Keterangan:
^a+ adalah 90 % atau lebih positif dalam satu atau dua hari;
 - adalah 90 % atau lebih negatif dalam satu atau dua hari;
 V adalah variabel
^b adalah mayoritas dari kultur *S. arizonae*: negatif
^c adalah mayoritas dari kultur *S. arizonae*: positif

Tabel B.5 - Reaksi biokimia dan serologi untuk non *Salmonella* sp.

No	Test substrat	Hasil
1	<i>Urease</i>	positif (warna ungu-merah)
2	<i>Indole test</i> dan <i>polivalent flagellar test</i> (H)	positif (permukaan warna nila) negatif (tidak ada penggumpalan)
3	<i>Lysine decarboxylase</i> dan KCN broth	positif (ada pertumbuhan) negatif (warna kuning)
4	<i>Phenol red lactose broth</i>	positif (warna kuning dan/atau gas) ^{a,b}
5	<i>Phenol red sucrose broth</i>	positif (warna kuning dan/atau gas) ^b

Tabel B.5 (lanjutan)

No	Test substrat	Hasil
6	KCN broth, Voges-Proskauer test, dan Methyl red test	positif (ada pertumbuhan) positif (warna merah muda sampai merah) negatif (warna kuning menyebar)
Keterangan: ^a adalah test <i>malonate broth</i> positif jika biakan tersebut <i>S.arizonae</i> ^b adalah jangan dibuang biakan positif jika biakan LIA menunjukkan reaksi bercirikan <i>Salmonella sp.</i> , uji lebih lanjut untuk mengamati apakah spesies tersebut <i>Salmonella sp.</i>		

B.8.5 *Staphylococcus aureus*

B.8.5.1 Prinsip

Pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada pembenihan khusus setelah diinkubasi pada suhu 35 °C selama 45 jam sampai dengan 48 jam dan dilanjutkan dengan uji koagulase

B.8.5.2 Peralatan

- Inkubator 35 °C;
- oven;
- spreader* steril dari gelas;
- botol pengencer 500 ml;
- tabung reaksi;
- gelas ukur 1ml dan 10 ml;
- cawan petri;
- gelas sediaan;
- pipet ukur; dan
- jarum ose/inokulasi.

B.8.5.3 Perbenihan dan pereaksi

- Baird-parker* agar;
- brain heart infusion broth* (BHIB); dan
- plasma kelinci.

B.8.5.4 Cara kerja

- Lakukan persiapan dan homogenisasi contoh seperti pada B.8.1;
- pipet masing-masing 0,3 ml; 0,3 ml; 0,4 ml larutan contoh dari setiap seri pengenceran ke dalam masing-masing ke 3 cawan petri yang berisi media BPA;
- sebar contoh secara merata dengan menggunakan *spreader* steril. Tahan cawan dalam posisi tegak lurus sampai contoh diserap oleh medium (\pm 10 menit). Jika contoh tidak mudah terserap oleh medium, tempatkan cawan petri pada posisi tegak lurus di dalam inkubator selama 1 jam sebelum cawan petri dibalik;
- inkubasikan pada suhu 35 °C selama 45 jam sampai dengan 48 jam; dan
- pilih cawan petri yang mengandung 20 koloni sampai dengan 200 koloni dan hitung tersangka koloni *Staphylococcus aureus*, yaitu koloni berwarna abu-abu sampai hitam mengkilat dengan lingkaran cerah disekelilingnya dan seringkali lingkaran jernih, koloni mempunyai getah kental ketika disentuh dengan jarum ose.

B.8.5.5 Uji koagulase

- Pindahkan 5 sampai dengan 10 koloni tersangka ke dalam tabung berisi 0,2 ml sampai dengan 0,3 ml *Brain Heart Infusion Broth* (BHIB);
- inkubasikan pada suhu 35 °C selama 18 jam sampai dengan 24 jam;
- tambahkan koagulasi plasma kelinci sebanyak 0,5 ml ke dalam kultur BHIB dan campur;
- inkubasikan campuran plasma kelinci dengan biakan BHIB pada 35 °C selama 18 jam sampai dengan 24 jam dan memeriksanya, setelah 6 jam akan terbentuk penggumpalan. Hanya bentuk yang kokoh dan sempurna serta dapat bertahan di dalam wadahnya ketika tabung dibalikkan disebut sebagai positif *Staphylococcus aureus*;
- amati ada tidaknya koagulasi. Bila tidak terjadi koagulasi, lanjutkan inkubasi pada suhu kamar selama 24 jam, dan amati kembali ada tidaknya koagulasi;
- ratakan koloni (n) dari ketiga cawan petri yang diwakili oleh koloni-koloni yang memberikan reaksi penggumpalan dan dikalikan dengan faktor pengenceranya; dan
- hitung jumlah *Staphylococcus aureus* dalam 1 g atau 1 ml contoh.

B.8.5.6 Perhitungan

Angka *Staphylococcus aureus* (koloni/g) = $n \times F$

Keterangan:

n adalah jumlah koloni, dinyatakan dalam koloni per gram (koloni/g);

F adalah faktor pengenceran dari rata-rata koloni yang dipakai.

B.8.6 Kapang dan khamir

B.8.6.1 Prinsip

Pertumbuhan kapang dan khamir dalam media yang sesuai, setelah diinkubasikan pada suhu $(25 \pm 1) ^\circ\text{C}$ selama 5 hari.

B.8.6.2 Peralatan

- Inkubator $(25 \pm 1) ^\circ\text{C}$ terkalibrasi;
- autoklaf;
- penangas air $(45 \pm 1) ^\circ\text{C}$;
- alat penghitung koloni;
- mikroskop;
- cawan petri 15 mm x 100 mm; dan
- pipet ukur 1 ml dan 10 ml.

B.8.6.3 Pembenihan dan pengencer

Pilihan penggunaan media:

- Media dengan penambahan larutan antibiotik;
 - *dichloran rose bengal chloramphenicol* (DRBC) agar;
 - *dichloran 18 % glycerol* (DG 18) agar;
 antibiotik ditambahkan dalam media kapang dan khamir untuk mencegah pertumbuhan bakteri. *Chloramphenicol* adalah salah satu pilihan antibiotik, karena stabil saat diautoklaf. Konsentrasi antibiotik yang diizinkan adalah 100 mg per liter media. Jika tampak pertumbuhan bakteri, siapkan media dengan penambahan 50 mg per liter

chloramphenicol sebelum autoklaf dan 50 mg per liter *chlortetracycline* steril saat media mulai di kondisikan, tepat sebelum menuang media dalam cawan.

- b) *plate count agar* (PCA);
tambahkan 100 mg *chloramphenicol* per liter jika menggunakan media ini. Media ini tidak cocok jika diduga ada kapang yang menyebar (contoh *Mucor*, *Rhizopus* dll);
- c) *malt agar* (MA);
- d) *malt extract agar* (kapang dan khamir) (MEAYM); atau
- e) *potato dextrose agar* (PDA):

- <i>infusion from white potatoes</i>	200 g
- <i>dextrose</i>	20 g
- <i>agar</i>	20 g
- <i>air suling</i>	1000 ml

Larutkan semua bahan di atas. Masukkan dalam labu, sterilkan pada 121 °C selama 15 menit. Sebelum dipergunakan dinginkan sampai 50 °C dan pH diatur 3,5 dengan asam tartrat 10 % steril. Penurunan pH dapat diganti dengan penambahan 4 ml antibiotik (1g/100ml). Campurkan, kemudian tuangkan ke dalam cawan petri.

B.8.6.4 Cara kerja

- a) Lakukan persiapan dan homogenisasi contoh sesuai B.8.1;
- b) terdapat dua metode persiapan media dalam cawan, yaitu :
 - metode menyebar pada cawan (untuk pilihan media DRBC dan DG 18):
pipet 0,1 ml masing-masing pengenceran secara aseptik ke dalam media padat dan sebarkan merata dengan menggunakan batang gelas.
 - metode menuang pada cawan (untuk pilihan media DG 18):
pipet 1,0 ml masing-masing pengenceran ke dalam cawan petri 15 mm x 100 mm dan sesegera mungkin tuangkan 20 ml sampai dengan 25 ml media. Campurkan dengan menggoyang cawan secara perlahan searah jarum jam, kemudian berlawanan arah jarum jam dalam jangka 1 menit sampai dengan 2 menit.
- c) biarkan hingga campuran dalam cawan petri membeku;
- d) pipet masing-masing 1 ml dari pengenceran 10^{-1} sampai dengan 10^{-2} ke dalam cawan petri steril secara duplo;
- e) masukkan semua cawan petri dengan posisi tidak terbalik ke dalam inkubator dan inkubasi pada ruang gelap bersuhu 25 °C selama 5 hari;
- f) hitung koloni kapang dan khamir (perhitungan dapat dilakukan mulai hari ke tiga sampai dengan hari ke lima). Jika setelah 5 hari tidak ada yang tumbuh, tambahkan waktu inkubasi selama 48 jam; dan
- g) nyatakan hasil perhitungan sebagai jumlah kapang dan khamir per gram contoh;

B.8.6.5 Pernyataan hasil

B.8.6.5.1 Cara menghitung

Cara menghitung kapang dan khamir seperti cara menghitung pada angka lempeng total.

B.8.6.5.2 Cara menghitung dan membulatkan angka

Cara menghitung dan membulatkan angka kapang dan khamir seperti cara menghitung dan membulatkan angka pada angka lempeng total.

Bibliografi

- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 986.15, Arsenic, Cadmium, Lead, Selenium, and Zinc in Human and Pet Foods, Multielement Method*, 18th Edition, Chapter 9.1.01.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 963.15, Fat in Cacao Products*, 18th Edition, Chapter 31.4.02.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 999.11, Lead, Cadmium, Copper, Iron, and Zinc*. 18th Edition, Chapter 9.1.09.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 971.21, Mercury in Foods, Atomic Absorption Spectrophotometric Method*, 18th Edition, Chapter 9.2.22.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 991.20, Nitrogen (Total) in Milk*, 18th Edition, Chapter 33.2.11.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 930.29, Protein in Dried Milk*, 18th Edition, Chapter 33.5.03.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 967.25, Salmonella sp. in Foods, Preparation of culture media and reagents*. 18th Edition, Chapter 17.9.01.
- Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia. Kategori Pangan. 2006.
- CODEX Alimentarius Commission. 1996, *FAO/WHO Codex Alimentarius Sampling Plans for Prepackaged Food (AQL-6.5) CAC/RM 42-1969*.
- Egan, H., Ronald S. Kirk, dan Ronald Sawyer. *Pearson's Chemical Analysis of Foods*. 1981. *Sugar and Preserves*. 8th Edition. Chapter 6.
- Egan, H., Ronald S. Kirk, dan Ronald Sawyer. *Pearson's Chemical Analysis of Foods*. 1981. *Dairy Products*, 8th Edition. Chapter 14.
- Food and Drug Administration. *Bacteriological Analytical Manual*. 2001. *Aerobic Plate Count*. Chapter 3.
- Food and Drug Administration. *Bacteriological Analytical Manual*. 2001. *Staphylococcus aureus*. Chapter 12.
- Food and Drug Administration. *Bacteriological Analytical Manual*. 2001. *Mold, Yeast and Mycotoxin*. Chapter 18.
- Food and Drug Administration. *Bacteriological Analytical Manual*. 2002. *Enumeration of Escherichia coli and The Coliform Bacteria*. Chapter 4.
- Food and Drug Administration. *Bacteriological Analytical Manual*. 2003. *Food Sampling and Preparation of Sample Homogenate*. Chapter 1.
- Food and Drug Administration. *Bacteriological Analytical Manual*. 2006. *Salmonella sp.*. Chapter 5.







BADAN STANDARDISASI NASIONAL - BSN
Gedung Manggala Wanabakti Blok IV Lt. 3-4
Jl. Jend. Gatot Subroto, Senayan Jakarta 10270
Telp: 021- 574 7043; Faks: 021- 5747045; e-mail : bsn@bsn.go.id